UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER AKTIVIERUNG DES C1 KOMPLEMENT MOLEKÜLS

1981

Johann Bauer

Untersuchungen zum Mechanismus der Aktivierung des C1 Komplement Moleküls.

Dissertation

der

Fakultät für Biologie

der

Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Johann Bauer

geboren zu Pestendorf

Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Fiedler

2. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Schwarzfischer

Tag der mündlichen Prüfung: 8.12.1981

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried in der Abteilung für Experimentelle Medizin unter der Leitung von Priv.Doz. Dr.G.Valet angefertigt.
Die Finanzierung der Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (SFB 37, Projekt A4) übernommen.

Herrn Dr.G.Valet bin ich zu großem Dank verpflichtet für die großzügige Förderung und Unterstützung dieser Arbeit.

Mein Dank geht auch an:

die Deutsche Forschungsgemeinschaft für die Bereitstellung einer Projektstelle;

Herrn Prof.Dr.G.Ruhenstroth-Bauer, dem Direktor der Abteilung für Experimentelle Medizin, für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes;

die Mitarbeiter der Abteilung für die kollegiale Zusammenarbeit;

Herrn Prof.Dr.F.Fiedler für die Vertretung bei der Fakultät für Biologie;

Herrn Prof.Dr.F.Schwarzfischer für das Erstellen des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. Einleitung	1
II. Material und Methoden	9
1. Chemikalien	9
2. Abkürzungen	10
3. Isolierung	11
a Euglobulinfällung	11
b Clq Anreicherung	11
c Clr und Cls auf DEAE Sepharose 6B Cl	12
d Clr auf CM Sepharose 6B Cl	14
e Clq, Clr und Cls auf Sephacryl S-300 Cl	14
3. Funktionelle Charakterisierung	15
a Hämolytische Titration	15
b Polyacrylamidgelelektrophorese	16
c ALTEE Abbau	17
d Cl Aktivierung auf EA Zellen	18
e Cl Aktivierung durch aggregiertes IgG	18
f Spontane Clr Aktivierung	19
g Cl Rekonstitution	19
4. Chemische Modifikation	20
a ^{125}J Markierung	20
b (^{14}C)DFP Markierung	20
c NO_2 Einbau	20
III. Ergebnisse	21
1. Isolation der Untereinheiten	21
2. Aggregation der Untereinheiten	24
3. Aktivität der isolierten Untereinheiten	25

4. Spontane Clr Aktivierung 26

a Einfluß von Ca^{2+} und EDTA 27

b Einfluß des DFP 28

c Einfluß der H^{+} Ionen 28

d Wirkung des DFP bei verschiedenen pH Werten 29

e Konzentrationsabhängigkeit 31

f Spaltprodukte 33

g (^{14}C)DFP Bindung 34

h Einfluß der Präparationsmethode auf die Stabilität 36

5. Zusammenhang zwischen spontaner Clr Aktivierung und hämolytischer Aktivität 37

a im Ca^{2+}-haltigen Puffer 37

b im EDTA-haltigen Puffer 38

c Wirkung von Temperatur, pH und Zeit 39

d Der Temperatureinfluß auf die Bindungskapazität von Clr 40

e Wirkung der Temperatur auf Cls und Clq 42

f Ergebnisse der Versuchsserie 43

6. Die Clr Aktivierung im Cl Molekül 43

a Isolierung einer Zwischenstufe 43

b Stabile NPGB Bindung an aktiviertes Cls 44

c NPGB Wirkung auf aktiviertes Clr 46

d NPGB Hydrolyse 47

e Ergebnisse der NPGB Hemmversuche 48

7. Konformatioinsänderungen während der Cl Komplexbildung und der Cl Aktivierung 49

a Cls Markierung 49

b Clr Markierung 50

c Der Einfluß von Clq und Cls auf die Markierbarkeit von Clr 51

d Der Einfluß von Clr und Cls auf die Markierbarkeit von Clq 52

e Veränderungen der Markierbarkeit durch Komplexbildung 54

8. Zusammenhang zwischen chemischer Modifikation der Cl Untereinheiten und ihrer Aktivität

a Die Aktivität des ^{125}J Clr 55

b Einfluß der Nitrierung auf die hämolytische Aktivität der Cl Untereinheiten 57

c Nitrierung hemmt Clq Aktivierungsaktivität 59

IV. Diskussion 60

V. Zusammenfassung 68

VI. Literaturverzeichnis 70

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41535726_0043

I. Einleitung

Vertebraten haben die Fähigkeit, zahlreiche Bakterien- und Virenarten, die in ihre Blutbahn eingedrungen sind, zu inaktivieren. Bereits um die Jahrhundertwende wurde gefunden, daß für diese Eigenschaft zwei Systeme des Blutplasmas verantwortlich sind (1-3). Die Antikörper erkennen Bakterien und Viren und binden an sie. Das Komplementsystem wird durch die gebundenen Antikörper aktiviert, wodurch die Mikroorganismen entweder lysiert werden oder ihre Opsonisierung durch phagocytierende Zellen gefördert wird. Es gelang erst 65 Jahre später, Proteine des Komplementsystems zu isolieren und zu charakterisieren, die bei der Beseitigung von Bakterien und Viren eine Rolle spielen (4,5). Seit dieser Zeit wurden 20 Proteine isoliert, die diesem System angehören (6,7). Das funktionelle Zusammenspiel dieser Proteine ist in Abb.1 dargestellt.

Nach Bindung des C1 Moleküls an Antigen-Antikörperkomplexe wird zunächst eine Kaskade von enzymatischen Reaktionen ausgelöst (6,7), der sogenannte "klassische Aktivierungsweg". Diese Kaskade kann in ihrer Wirkung durch den sogenannten "alternativen Weg" als einer positiven Rückkopplungsschleife (Abb.1: linke Seite, C3 mit Faktoren B und D) verstärkt werden. Der alternative Weg selbst kann unabhängig vom klassischen Weg durch Verschieben des Gleichgewichtes der Regelfaktoren im normalerweise stark gebremsten Rückkopplungsweg (Kurze Lebenszeit des C3bB Kom-

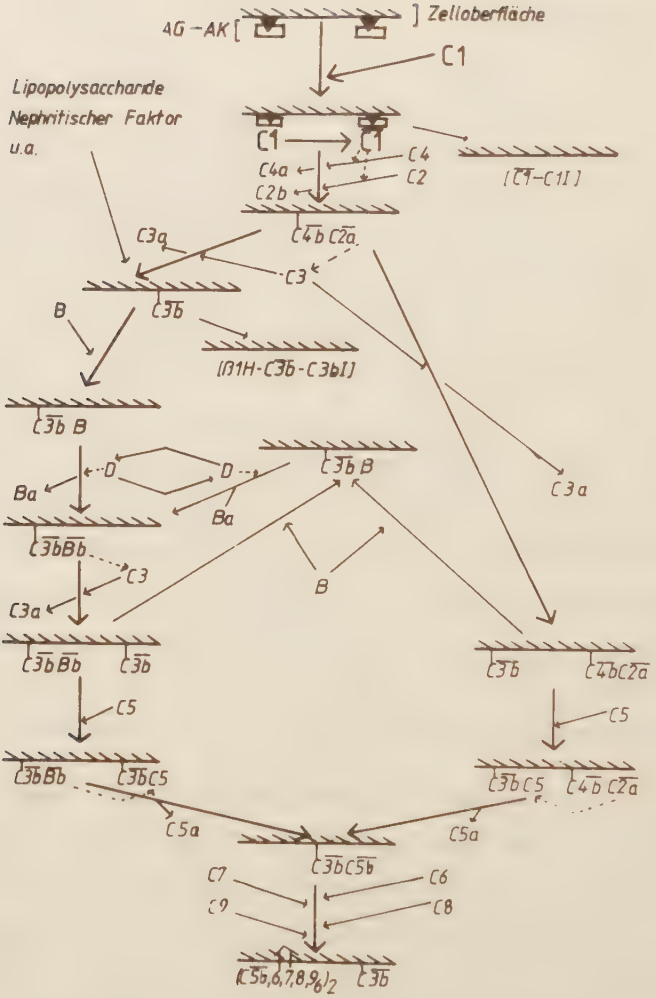

Abb.1: Schematische Darstellung des Komplementsystems. Die Nomenklatur wurde verwendet, wie von der World Health Organization empfohlen (1968). Die aktivierten Komponenten sind durch einen Querstrich gekennzeichnet, z.B. $C1\overline{r}$. Die übrigen Zeichen bedeuten: ⟶ Ablauf der Komplementreaktionen, - ⇝ proteolytischer Angriff, z.B. C2 - - → C3 = C2 spaltet C3; C3 kovalente Bindung an die Zelloberfläche. (gezeichnet nach (6,7)).

plexes, βlh geförderter Zerfall des Komplexes, Inaktivierung von C3b durch C3-Inaktivator) in Richtung Aktivierung des weiteren Systems verändert werden. Diese Veränderung kann durch Stabilisierung des C3bB Komplexes durch C3Nef, einem Autoantikörper gegen C3bB, oder durch Properdin, einem Serumprotein, bewirkt werden. Der Ablauf der im klassischen und alternativen Weg wirksamen enzymatischen Kaskade hat mindestens 3 verschiedene Effekte.

1. Es werden $C(5b-9)_2$ Komplexe gebildet, welche durch Einlagerung in biologische Membranen einerseits eukaryontische Zellen und Gram-negative Bakterien lysieren, andererseits membranumhüllte Viren inaktivieren.
2. Es entstehen niedermolekulare Peptide (C2b, C4a, C3a, C5a, Ba), die Kinin- oder Anaphylatoxin-Aktivität haben und teilweise Entzündungsmediatoren aus anderen Zellen freisetzen.
3. Es werden Proteine (C3b und C4b) kovalent an die Oberfläche der Fremdkörper gebunden. Dies fördert die Anlagerung der Fremdkörper an Leukocyten und die Phagocytose durch Makrophagen.

Die Hauptmöglichkeit, den klassischen Aktivierungsweg auszulösen, ist das C1 Molekül. Eine detailierte Kenntnis des Auslösemechanismus ist aus zwei Gründen wichtig. Aus medizinischer Sicht ist man daran interessiert, in den Vorgang durch Medikamente eingreifen zu können, weil sowohl ein unkontrollierter Ablauf der Reaktion als auch ein Versagen des Aktivierungsmechanismus schwere Folgen für die Gesundheit des Menschen haben können. Aus biochemisch

wissenschaftlicher Sicht ist es von Interesse, wie das Erkennen des Antigen-Antikörperkomplexes und die darauf folgende Bindung des C1 Moleküls daran in eine enzymatische Funktion umgesetzt wird. Deshalb steht das C1 Molekül bereits seit langen Jahren im Brennpnkt des Interesses, ohne daß es bisher möglich war, diesen Vorgang genau zu verstehen.

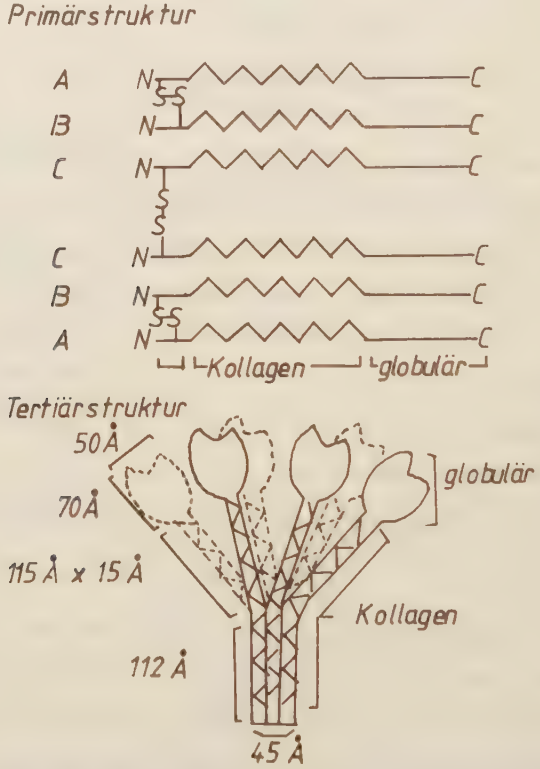

Abb.2: Schematische Darstellung der Clq Untereinheit (gezeichnet nach (7)).

Das C1 Molekül ist ein Ca^{2+}-abhängiger Proteinkomplex, der aus einer Clq und je zwei Clr und Cls Untereinheiten besteht

(8). Clq hat ein Molekulargewicht von 400 Kilodalton (KD) (9) und besteht aus 18 Polypeptidketten (10,11), die zu 6 identischen Untereinheiten zusammengelagert sind. Jede Untereinheit besteht aus 3 verschiedenen Ketten (Abb.2: A,B,C). Je zwei A-B und zwei C-C Ketten sind am NH_2-terminalen Ende durch Disulfidbrücken kovalent miteinander verbunden. Die Aminosäuresequenz der NH_2-terminalen Hälfte ist bei jeder Kette kollagenartig. Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen, daß das Clq Molekül die Gestalt eines Blumenstraußes aus 6 Blumen hat (12,13). Der NH_2-terminale Stiel besteht aus 6 kollagenartigen Tripelhelices (14,15). Die 6 COO^--terminalen "Blüten" sind aufgebaut wie globuläre Proteine. Diese "Blüten" oder Köpfe des Moleküls erkennen Antigen-Antikörperkomplexe, die zellgebunden oder in freier Form vorliegen (5,13). Sie binden an den Fc-Teil der Immunoglobine der Klasse IgG und IgM (16,17). Außerdem können sie auch an Polyanionen wie DNA oder Lipopolysaccharide binden (18). Die Bindung der einzelnen Köpfe erfolgt kooperativ (19). Für die Aktivierung ist dabei entscheidend, daß mehrere Köpfe an die Antikörper fixiert werden (20).

Die Komponenten Clr und Cls sind globuläre Serinproteasen, die im Körper als Zymogene synthetisiert werden (21-24). Je zwei Clr (MG 90 KD) und zwei Cls (MG 85 KD) bilden in Gegenwart von Ca^{2+} ein Tetramer, das sich an den Kollagenteil des Clq anlagert (25,26) (Abb.3). Wird Clq an einen Aktivator gebunden, dann wird Clr so gespalten, daß ein NH_2-terminales Isoleucin frei wird (27). Dieses Ile ist charakteristisch für viele Serinproteasen (28,29). Es

verändert die Enzymtasche des C1r so, daß es C1s spalten kann. Durch die Spaltung wird auch C1s zu einer aktiven Serinprotease (21,30). $C1\bar{s}$ repräsentiert die C1 Aktivität nach außen. Es kann seine natürlichen Substrate C2 und C4 aktivieren und dadurch den Ablauf des Komplementsystems induzieren (31). Es kann aber auch synthetische Ester wie N-Acetyl-L-Tyrosinäthylester (ALTEE) spalten (21).

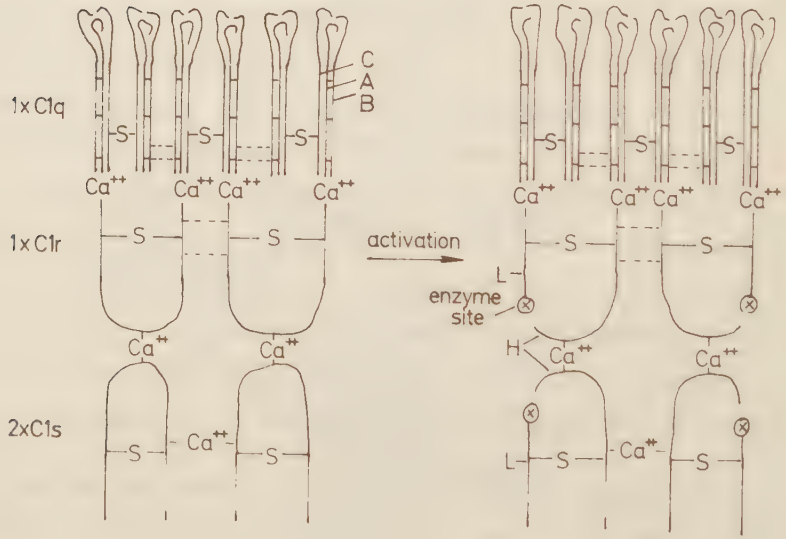

Abb. 3: Schematische Darstellung des C1 Makromoleküls. Der Ca^{2+}-abhängige Proteinkomplex besteht aus einem C1q Molekül, einem C1r Dimer und aus 2 C1s Molekülen. Bei der Aktivierung werden die globulären C1r und C1s Moleküle in 2 Ketten zerlegt (H- und L-Kette), welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Die enzymatisch aktiven Stellen liegen jeweils auf der L-Kette. In den nativen Molekülen bleiben die Ketten beieinander; auf einer SDS Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen können sie getrennt werden (gezeichnet nach Valet).

Ein unklarer Punkt im Ablauf der C1 Aktivierung ist, wie im C1 Molekül die C1r Untereinheit aktiviert wird, wenn die Köpfe des C1q an Antigen-Antikörper-Komplexe gebunden werden. Da im C1q bisher noch keine Proteaseaktivität nachgewiesen wurde und da die kollagenähnliche Struktur keine Proteaseaktivität vermuten läßt, scheint C1r die erste Protease des Systems zu sein. Es war Aufgabe dieser Arbeit, einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten: Wie wird die erste Protease der enzymatischen Kaskade durch Spaltung aktiviert?

Da es nicht gelungen war, in diesem intramolekularen Prozeß eine diskrete Zwischenstufe zu erkennen, beruhen die bisherigen Kenntnisse über den Aktivierungsmechanismus zum großen Teil auf Hypothesen, die auf Grund verschiedener experimenteller Ergebnisse aufgestellt wurden. Es wurde gefordert, daß C1q in einem temperaturabhängigen Prozeß seine Konformation ändert, bevor es C1r aktiviert (32). Andere C1 Aktivierungsexperimente führten zu der Schlußfolgerung, daß während der Aktivierung ein intermediäres C1r* existieren müsse. Dieses C1r* ist noch in der Proenzymform, ist aber bereits in der Lage, C1r zu aktivieren oder den Proteaseinhibitor p-Nitrophenol-p'-Guanidinobenzoat (NPGB) zu binden (33,34). Die Vermutung, daß C1r seine Konformation ändert, wurde zusätzlich durch Ca^{2+} Bindungsexperimente unterstützt, die zeigten, daß aktiviertes $C1\bar{r}$ und komplexgebundenes C1r Proenzym mehr Ca^{2+} Ionen pro Molekül binden als isoliertes C1r Proenzym (35). Auf Grund anderer Untersuchungen wurde gefordert, daß alle

Konformationsänderungen, die während der Aktivierung ablaufen, dadurch beschleunigt würden, daß Cl Moleküle, die nicht gebunden sind, mit den zellgebundenen interagieren (36). Der gemeinsame Nenner aller Versuchsergebnisse ist: Bei der Bindung des Cl an Antigen-Antikörperkomplexe wird die Konformation des Clq geändert. Das geänderte Clq löst im Clr Molekül einen intramolekularen Autoaktivierungsvorgang aus.

Die Vermutung, daß Clr die eigene Polypeptidkette spalten kann, wurde noch durch eine weitere Beobachtung unterstützt. Isoliertes Clr hat die Tendenz, in einem EDTA-haltigen Puffer bei 37 °C spontan, das heißt ohne Zusatz eines fremden Stoffes oder Enzyms, zu aktivieren (33,37-41). Diese spontane Clr Aktivierung schien damit ein Modell zu sein, um die Vorgänge zu studieren, die während der Clr Aktivierung im Cl Molekül ablaufen. Unterstützt wurde diese Auffassung auch dadurch, daß aktiviertes $Cl\bar{r}$ nicht in der Lage ist, Clr Proenzyme zu aktivieren (33). Andere Forscher vertraten allerdings die Meinung, daß die beobachtete spontane Clr Aktivierung auch durch Proteasen verursacht wird, die als Spurenverunreinigung in den Präparationen vorhanden sind (33,41).

Auf Grund der Vorarbeiten wurden in dieser Arbeit folgende Fragen untersucht:

1. Ist die spontane Clr Aktivierung bei 37 °C im EDTA-haltigen Medium eine intramolekulare Eigenschaft des Clr Moleküls?

2. Worauf beruht die Wirkung des EDTA bei der Selbstaktivierung?

3. Wie wirkt NPGB?

4. Verändert die C1 Komplexbildung und die C1 Aktivierung die ^{125}J Markierbarkeit der einzelnen Untereinheiten?

5. Hat die Substitution von Tyrosinresten in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe einen Einfluß auf die Aktivität der Untereinheiten C1q, C1r und C1s?

II. Material und Methoden

Chemikalien:	Firma:
Humanserum	Blutbank, München
Meerschweinchenserum	MPI Biochemie, Martinsried
Schafblut	MPI Biochemie, Martinsried
Komplement C2	Cordis, Miami, USA
P-Nitrophenol-p'Guanidinobenzoate (NPGB)	Sigma, St.Louis, USA
Diisopropylfluorophosphat (DFP)	Fluka, Buchs, Schweiz
Kaninchen-anti-Schaf-Antikörper	Behring, Mannheim, BRD
Säulenmaterialien:	Pharmacia, Uppsala, Schweden
DEAE Sepharose 6B-CL	
CM Sepharose 6B-CL	
Sepharose S-300 CL	

CNBR aktivierte Sepharose 4B-CL	
^{125}J und (^{14}C)DFP	New England Nuclear, Boston, USA
Rinderserum Albumin (BSA)	Boehringer, Mannheim, BRD
Gelatine	Difko, USA

Alle übrigen Chemikalien wurden von Merck, Darmstadt, bezogen und waren von pro analysi Qualität. Für die Puffer wurde entionisiertes Wasser verwendet.

Abkürzungen

ALTEE	N-Acetyl-L-Tyrosinäthylester
B	Faktor B des Komplementsystems
BSA	Rinderserumalbumin
C1...C9	Komplementkomponenten C1 bis C9
CM	Carboxymethyl
CNBR	Cyanogenbromid
$C(NO_2)_4$	Tetranitromethan
D	Faktor D des Komplementsystems
DEAE	Diäthylaminoäthan
DFP	Diisopropylfluorophosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiaminotetraessigsäure
EA	Schaferythrocyten, die mit Antikörper beladen sind
IgG	Immunoglobulin G
KD	Kilodalton
NPGB	P-Nitrophenol-p'-Guanidinobenzoat
pg	Picogramm
PPO	2'5'-Diphenyloxazol
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

VBS-S Puffer: 5 mM Na-Barbiturat, 60 mM NaCl, 120 mM Saccharose

VBS-EDTAPuffer: 5 mM Na-Barbiturat, 130 mM NaCl, 20 mM EDTA

w/v Gewicht/Volumen

Isolierung

Euglobulinfällung

Die Komponenten des C1 Moleküls wurden einzeln aus frischem Humanserum isoliert. Im Prinzip wurde dabei nach einer Methode von Valet und Cooper verfahren (21). Ungefähr 1200 ml Humanserum wurden auf 0 °C abgekühlt. Der pH des Serums wurde je nach Präparation mit Eisessig auf Werte zwischen 6.5 und 7.3 eingestellt. Dann wurde das Serum über Nacht gegen 10 Liter 13 mM Tris/ 12 mM Acetat Puffer dialysiert, dessen elektrische Leitfähigkeit mit 21 mM NaCl auf 2.9 mSiemens (22 °C) eingestellt war und dessen pH dem des Serums angeglichen war. Das Präzipitat wurde zweimal durch Zentrifugation mit Dialysepuffer gewaschen. Wurde C1r und C1s in aktivierter Form isoliert, dann wurde nach dem 2. Waschschritt das Präzipitat 25 Minuten bei 37 °C inkubiert.

C1q Anreicherung

Das gewaschene Präzipitat, das C1r und C1s entweder als Enzym oder als Proenzym und C1q enthielt, wurde in 150 ml 40 mM Phosphatpuffer pH 7.5 suspendiert, der zusätzlich 50 mM NaCl und 1 mM EDTA enthielt und eine Stromleitfähigkeit von 9 mSiemens (22 °C) hatte. Die Suspension wurde zentrifugiert. Aus dem Überstand wurden C1r und C1s isoliert. Der Niederschlag enthielt C1q. Er wurde in einem 0.75 M NaCl 10

mM EDTA Puffer pH 5 homogenisiert. Nach der anschließenden Zentrifugation wurde der Überstand gegen einen 100 mM EDTA Puffer pH 5 dialysiert (42). Das Präzipitat wurde mit Dialysepuffer gewaschen und in einem 0.3 M NaCl 10 mM EDTA Puffer pH 7.5 homogenisiert. Nach dem Zentrifugieren enthielt der Überstand reines Clq.

Clr und Cls auf DEAE Sepharose 6B

Die im Phosphatpuffer des Überstandes gelösten Proteine wurde auf eine DEAE Sepharose 6B-CL Säule aufgetragen. Die Säule hatte einen Durchmesser von 3 cm und eine Höhe von 30 cm und war mit dem oben beschriebenen Phosphatpuffer äquilibriert. Das aufgetragene Protein wurde mit 4 Liter Äquilibrierpuffer gewaschen und mit einem NaCl Gradienten eluiert. Der Gradient wurde aus 2 x 2.5 l gemischt und stieg linear von 11 mSiemens (22 ^{o}C) bis 25 mSiemens (22 ^{o}C) an. Im Eluat, das in Fraktionen zu 30 ml gesammelt wurde, lag die Clr Aktivität bei einer Pufferleitfähigkeit von 14.5 mSiemens (22 ^{o}C) und die Cls Aktivität bei 22 mSiemens (Abb.4). Die Aktivität wurde als hämolytische Cl Aktivität (siehe unten) nach Cl Rekonstitution der untersuchten Komponente mit einem Überschuß der jeweils fehlenden Cl Untereinheiten und mit Ca^{2+} bestimmt. Die Clr- und Cls-haltigen Fraktionen wurden jeweils gepoolt und durch Ultrafiltration (Amicon Corporation, Lexington, USA) auf ein Volumen von 50 ml (Clr) und 2 ml (Cls) eingeengt.

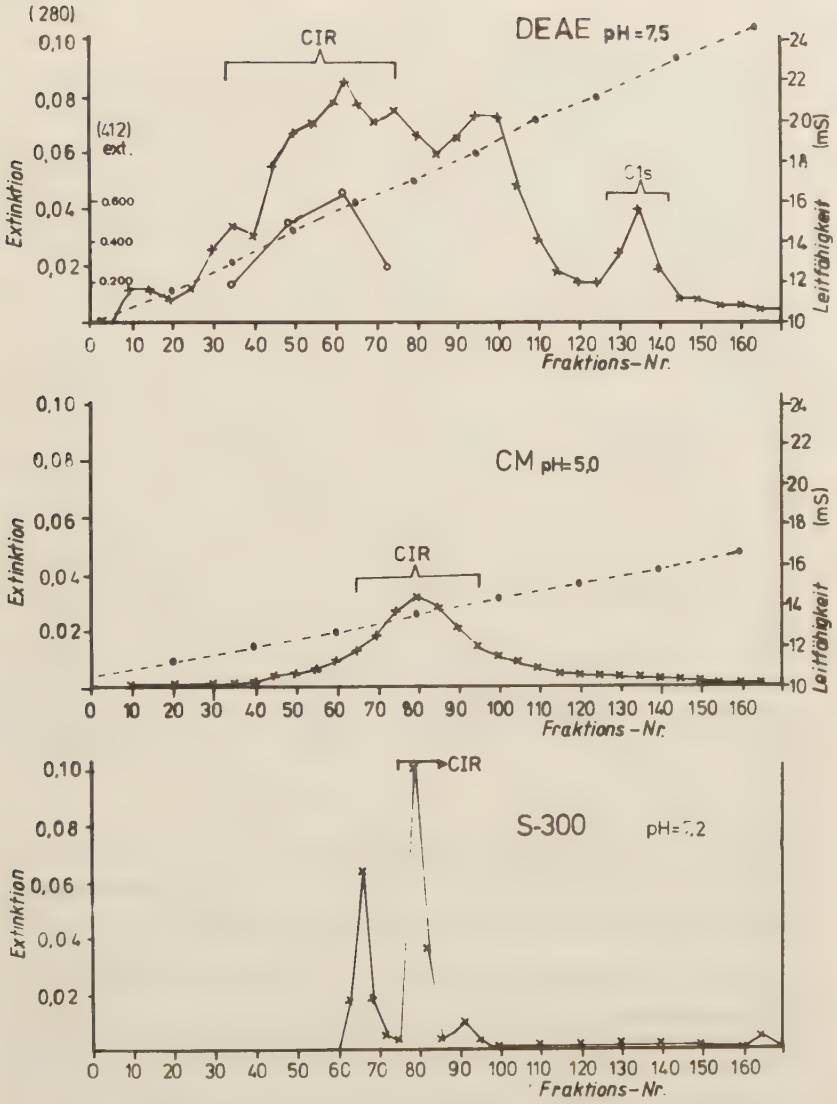

Abb.4: Säulenchromatographische Schritte während der Isolierung der Clr und Cls Proenzyme. Die Proteinmenge der Säuleneluate wurde durch optische Analyse bei 280 nm bestimmt (x——x), die Molarität des NaCl Gradienten durch Messen der elektrischen Leitfähigkeit (●- - -●) und die Enzymaktivität durch hämolytische Titration (o——o).

Clr auf CM Sepharose 6B

Der Clr Pool wurde auf eine Pufferleitfähigkeit von 9 mSiemens (22 °C) durch Verdünnen mit destilliertem Wasser und einem pH von 5 durch Zugabe von konzentrierter Salzsäure eingestellt und dann auf eine CM Sepharose 6B-CL Säule aufgetragen. Diese hatte eine Dimension von 2 cm x 18 cm und war mit einem 40 mM Phosphatpuffer pH 5 äquilibriert, der 50 mM NaCl und 0.3 mM EDTA enthielt und eine Leitfähigkeit von 9 mSiemens (22 °C) hatte. Das Protein wurde mit 1 l Äquilibrierpuffer gewaschen. Bei diesem Schritt wurde aktiviertes $Cl\bar{r}$ ausgewaschen. Clr Proenzym wurde mit einem NaCl Gradienten eluiert, der linear von 11 mSiemens bis 18 mSiemens anstieg und aus zweimal je einem Liter gemischt wurde. Fraktionen (je 10 ml) mit Clr Aktivität, die bei einer Pufferleitfähigkeit von 14 mSiemens gefunden wurden, wurden gepoolt und durch Ultrafiltration auf ein Volumen von 2 ml eingeengt.

Clq, Clr und Cls auf Sephacryl S-300

Alle Untereinheiten wurden in einem letzten Reinigungsschritt über ein Molekularsieb geschickt. 1 ml einer Probe mit einer Proteinkonzentration von 5 - 10 mg/ml wurde durch Unterschichten auf eine Sepharose S-300 CL Säule aufgetragen, die eine Dimension von 2.5 cm x 90 cm hatte und mit einem 0.5 M NaCl, 1 mM EDTA Puffer äquilibriert war. Der pH war mit 40 mM Phosphat auf 7.2 gepuffert. Es wurden Fraktionen mit je 2.5 ml gesammelt und solche, welche die jeweils aufgetragene Cl Untereinheit enthielten, wurden

gepoolt. Das Protein dieser Pools wurde durch Zugabe von 30% (w/v) Ammoniumsulfat gefällt. Der Niederschlag wurde nach der Zentrifugation in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris/HCL Puffer pH 7.5 gelöst. Die gewonnenen Proteinmengen wurden nach Lowry et al. (43) oder Bradford (44) bestimmt. Im Durchschnitt wurden pro Präparation 50 mg Clq, 5 mg Clr und 18 mg Cls gewonnen. Während aller Präparationsschritte wurde sorgfältig darauf geachtet, daß die Temperatur aller Proteinlösungen immer zwischen 0 und 4 ^{o}C blieb. Proteaseinhibitoren wie DFP wurden während der Präparationen nicht verwendet (24,45).

Funktionelle Charakterisierung

Hämolytische Titration

Die Aktivität der Untereinheiten Clq, Clr und Cls in den Säulenfraktionen oder nach Inkubation mit verschiedenen Reagentien wurde durch hämolytische Titration bestimmt (21,24). Es wurde dabei ermittelt, wieviel Picogramm (pg) der untersuchten Untereinheit bei einem Überschuß der beiden übrigen Komponenten nötig sind, um 50% einer vorgegebenen Erythrocytensuspension zu lysieren. Limitierte Mengen von Clq wurden mit 150 pg Clr, 90 pg Cls und 2mM Ca^{2+}, limitiertes Clr mit 300 pg Clq, 90 pg Cls und 2 mM Ca^{2+} und limitiertes Cls mit 300 pg Clq, 150 pg Clr und 2mM Ca^{2+} zu 1.1×10^{7} Schaferythrocythen gegeben. Diese waren mit Kaninchen-anti-Schaf-Antikörper optimal sensibilisiert (EA-Zellen), mit der Komplementkomponente C4 beladen und in 0.1 ml niederionigem (VBS-S) Puffer (6 mSiemens 22 ^{o}C)

suspendiert, der mit 5 mM Na-Barbiturat auf pH 7.5 eingestellt war und neben 60 mM NaCl sowohl 180 mM Saccharose als auch 0.3% (w/v) Gelatine enthielt (46). Während der anschließenden Inkubation (15 Minuten 37 ^{o}C) wurden nur vollständige C1 Moleküle an die Zellen gebunden. Die Zellen wurden nun gewaschen, in 0.1 ml Ausgangspuffer resuspendiert und nach Zugabe von 10 µl der Komplementkomponente C2 (ca. 10 CH50 Einheiten, 1 CH50 Einheit lysiert 50% der Erythrocyten eines Testansatzes) erneut 15 Minuten bei 37 ^{o}C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Meerschweinchenserum zupipettiert, das 1:20 in einem EDTA (20 mM) haltigen Puffer verdünnt war, der 130 mM NaCl, 5 mM Barbiturat und 0.3% Gelatine enthielt und auf pH 7.5 eingestellt war (VBS-EDTA) (47). In Gegenwart von EDTA waren nur noch die Komplementkomponenten C3-C9 des Meerschweinchenserums aktiv. Es wurden unter diesen Bedingungen nur die Zellen lysiert, die aktiviertes C2 auf ihrer Oberfläche gebunden hatten. Bei der Lyse wurde Hämoglobin in den Überstand freigesetzt. Die Menge des freigesetzten Hämoglobins war proportional der Menge der lysierten Zellen und wurde im Photometer bei 412 nm bestimmt (Gilford, Oberlin, Ohio).

Polyacrylamidelektrophorese

Die Sauberkeit der Clq, Clr und Cls Präparationen wurde durch SDS Polyacrylamidelektrophorese bestimmt (48). Die aktivierten $\overline{Clr}$ und $\overline{Cls}$ Untereinheiten, deren Aminosäureketten gespalten waren, konnten auf einem SDS Gel nach Reduktion jeweils in eine H- und eine L-Kette zerlegt werden, die Clq Einheit in ihre A, B und C Ketten. Vor der

Elektrophorese wurden die Proben, die außer dem Protein noch 1.5% (w/v) SDS, 12% (w/v) Saccharose, Bromphenolblau und, wenn reduzierende Bedingungen gewählt wurden, 2.5% (v/v) Mercaptoäthanol enthielten, 7 Minuten bei 100 ^{o}C gekocht. Die Elektrophorese wurde auf einem 8%igen Polyacrylamid Flachgel durchgeführt, das 0.1% (w/v) SDS enthielt. Als Laufpuffer wurde ein 0.1 M Phosphatpuffer pH 7.2 verwendet. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Blau G 200 oder bei geringen Proteinmengen (< 1 µg) mit Silber gefärbt (49). Die Menge des an die Proteinbanden gebundenen Farbstoffes wurde durch quantitative optische Analyse in einem Scanning Densitometer (Biomed, Chicago, Illinois) mit einem Helium-Neon Laser als Lichtquelle und einer Spaltbreite von 0.01 mm bestimmt. Gele, die mit radioaktiven Proteinen beladen waren, wurden zunächst parallel zur Laufrichtung in Streifen geschnitten. Die einzelnen Streifen wurden dann in 20 gleiche Scheibchen unterteilt, deren Radioaktivität bestimmt wurde. ^{125}J Radioaktivität wurde in einem Gamma 2000 Spektrometer (Beckman, Irvine, Kalifornien) gezählt, die ^{14}C Radioaktivität in einem Liquid Scintillation Spektrometer (Intertechnique, Plaisir, Frankreich). Als Szintillationsflüßigkeit wurden ein Gemisch aus 5 ml Äthylenglykol-monomethyläther und 10 ml Toluol mit 6% PPO verwendet.

ALTEE Abbau

Die funktionelle Aktivität des C1 Molküls gegenüber den Komponenten C2 und C4, die durch die Protease- und Esteraseaktivität des C1s repräsentiert wird, wurde im

Photometer getestet (21). $C1\bar{s}$ kann das Substrat N-Acetyl-L-Tyrosinäthylester spalten. Der Extinktionskoeffizient (E238) des Spaltproduktes N-Acetyl-L-Tyrosin ist niedriger als der des Ausgangsproduktes. Dies wurde zur Quantifizierung ausgenutzt. 5 µg Cls wurden in 600 µl 0.14 M NaCl 10 mM Tris/HCl Puffer (15 mSiemens, pH 7.5) verdünnt und zusammen mit 1 mM ALTEE bei 37 °C inkubiert. Die Extinktionsabnahme während der Inkubation war ein Maß für die Cls Aktivität.

Cl Aktivierung auf EA Zellen

^{125}J markierte Clr oder Cls Proenzyme wurden mit 10-fachem Überschuß an kalten Clq, Cls oder Clq, Clr Untereinheiten in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} zu Cl rekonstituiert. Das rekonstituierte Cl wurde an sensibilisierte Schaferythrocyten gebunden und durch 15minütige Inkubation bei 37 °C aktiviert. Die Zellen wurden dann über ein Phthalsäuredibutylesterkissen zentrifugiert, um nicht gebundenes Cl abzutrennen. Das Pellet wurde in einem VBS-EDTA Puffer (47) suspendiert, um das zellgebundene Cl Molekül in die Untereinheiten zu zerlegen und damit wieder von den Zellen abzulösen. Die Probe wurde erneut zentrifugiert und der Überstand, der die ^{125}J markierten Clr oder Cls Komponente enthielt, wurde auf ein SDS Gel aufgetragen.

Cl Aktivierung durch aggregiertes IgG

Kaltes Clq, Clr und Cls wurden bei einer Konzentration von 20 µg/ml, 10 µg/ml und 10 µg/ml in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} zu Cl rekonstituiert. Das Cl wurde nun zusammen mit aggregiertem humanen IgG in einer Konzentration von 100

µg/ml bei 37 °C inkubiert. Die Aggregation wurde durch 10 Minuten 63 °C Inkubation des IgG bewirkt. Zu bestimmten Zeitpunkten wurden aus dem Inkubationsgefäß Proben entnommen und auf eine SDS Polyacrylamidelektrophorese aufgetragen.

Spontane C1r Aktivierung

Die Tendenz des isolierten C1r, spontan zu aktivieren, wurde dadurch untersucht, daß C1r bei einer Konzentration von 1 mg/ml bei 37 °C zwischen 15 und 120 Minuten in einem 0.14 M NaCl Puffer pH 7.5 inkubiert wurde. Die Puffer enthielten 10 mM Tris/HCl als Puffersubstanz und zusätzlich entweder 3 mM Ca^{2+} (=Ca^{2+} Puffer) oder 3 mM EDTA (=EDTA Puffer). Zur Stabilisierung der C1r Präparationen wurde 1 mg/ml C1r mit 10 mM DFP (45) in einem 0.14 M NaCl Puffer pH 7.6, der neben 50 mM Tris/HCl als Puffersubstanz entweder 3 mM Ca^{2+} oder 3 mM EDTA enthielt, 5 Minuten oder 14 Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert. Alle Proben wurden nach der Inkubation einer SDS Gelelektrophorese unterworfen.

C1 Rekonstitution

Wenn die C1 Rekonstitutionsfähigkeit des C1r untersucht wurde, wurden 50 ng C1r mit geeigneten molaren Mengen C1q und ^{125}J C1s zu 10^8 sensibilisierten Schaferythrocyten gegeben, die in 0.1 ml VBS-S Puffer suspendiert waren. Zur Testung der C1rs Komplexbildung wurde ^{125}J markiertes C1r zu Sepharose-4B gekoppelten C1s (50) gegeben. Die Sepharose war in einem 3 mM Ca^{2+} haltigen 0.14 M NaCl 10 mM Tris/HCl Puffer pH 7.5 mit einer Leitfähigkeit von 15 mSiemens (22 °C) suspendiert. Nach 30minütiger Inkubation bei 0 °C wurden

die Sepharose oder die Zellen gewaschen. Anschließend wurde die spezifisch gebundene Radioaktivität gezählt.

Chemische Modifikation der Proteine

^{125}J Markierung

Die Komponenten Clq, Clr und Cls wurden bei einer Konzentration von 0.5 mg/ml nach der Chloramin T Methode (51) mit trägerfreiem ^{125}J markiert. Ungefähr 40% des angebotenen ^{125}J wurden in die Proteine eingebaut. Dabei wurde eine spezifische Radioaktivität von 0.8 mCi/mg erreicht. Daraus wurde ein molares Markierungsverhältnis des ^{125}J zu Clq oder Clr oder Cls von 0.04 berechnet. Dies bedeutete, daß 4% der vorhandenen Proteine ^{125}J eingebaut hatten, wenn man von der Annahme ausgeht, daß ein Jodmolekül je Proteinmolekül gebunden war. Die freie Radioaktivität wurde durch zweimalige Dialyse gegen einen 2000 - fachen Überschuß von 0.2 M NaCl, 10 mM Tris/HCl Puffer pH 7.5 entfernt.

(^{14}C)DFP Markierung

Clr wurde in einem 0.2 M NaCl 25 mM Tris/HCl Puffer pH 7.6 in einer Konzentration von 0.5 mg/ml gelöst. Dann wurde es mit 0.2 mM (^{14}C)DFP 14 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Das nicht gebundene DFP wurde durch Dialyse entfernt. Die Menge und die Lokalisation des (^{14}C)DFP Einbaus wurden durch SDS Polyacrylamidelektrophorese bestimmt.

NO_2 Einbau

Bei der ^{125}J Markierung wurden die Tyrosine in nur 4% der

vorhandenen Proteine in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe chemisch verändert. Um die Wirkung der chemischen Veränderung auf die funktionelle Aktivität testen zu können, wurden die C1 Untereinheiten in einer der Jodierung analogen Reaktion möglichst vollständig mit NO_2 substituiert (55). Diese Reaktion hat gegenüber der Jodierug den Vorteil, daß hier die dissoziierten Tyrosine aller vorhandenen Proteine in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe mit NO_2 substituiert werden. Die C1 Untereinheiten wurden separat bei einer Konzentration von 1 mg/ml mit 10 mM $C(NO_2)_4$ 7 Stunden bei 0 ^oC inkubiert. Nach der Dialyse wurden die hämolytische Aktivität und die Inkorporationsfähigkeit der Komponenten in zellgebundenes C1 bestimmt.

III. Ergebnisse

Isolation der Untereinheiten

Die isolierten C1 Untereinheiten zeigten auf SDS Polyacrylamidgelen die aus der Literatur (33,36,37,52) bekannten Banden (Abb.5). Unter nicht reduzierenden Bedingungen ergaben sich Proteinbanden für C1q bei 60 KD und bei 54 KD, für C1r bei 90 KD und für C1s bei 85 KD. Die C1q Bande bei 60 KD entspricht dem a-b und die bei 54 KD dem c-c Dimer. Die Bande in der Nähe des C1q Auftrags ist aggregiertes C1q. Sie wurde nicht beobachtet bei Elektrophorese von sehr verdünntem radioaktiven C1q, weil bei dieser Konzentration C1q nicht mehr aggregierte (Abb.24). Unter reduzierenden Bedingungen wies C1q drei

Banden bei 28 KD, 26 KD und 22 KD, C1r Proenzym eine Bande bei 90 KD und C1s Proenzym eine bei 85 KD auf. Aktiviertes $C1\overline{r}$, das unter nicht reduzierenden Bedingungen genauso wie das Proenzym als eine Bande wanderte, wurde in Gegenwart von Mercaptoäthanol in zwei Ketten zerlegt, von denen die eine ein Molekulargewicht von 60 KD (H-Kette) und die andere ein Molekulargewicht von 35 KD (L-Kette) hatte. Ähnlich wurde auch aktiviertes $C1\overline{s}$ nur unter reduzierenden Bedingungen in zwei Ketten zerlegt, in eine H-Kette mit 60 KD und in eine L-Kette mit 25 KD. Das Auftreten der H- und L-Ketten verbunden mit der Abnahme der Proenzymkette wurde nach Coomassie Blau Färbung im Densitometer quantitativ bestimmt.

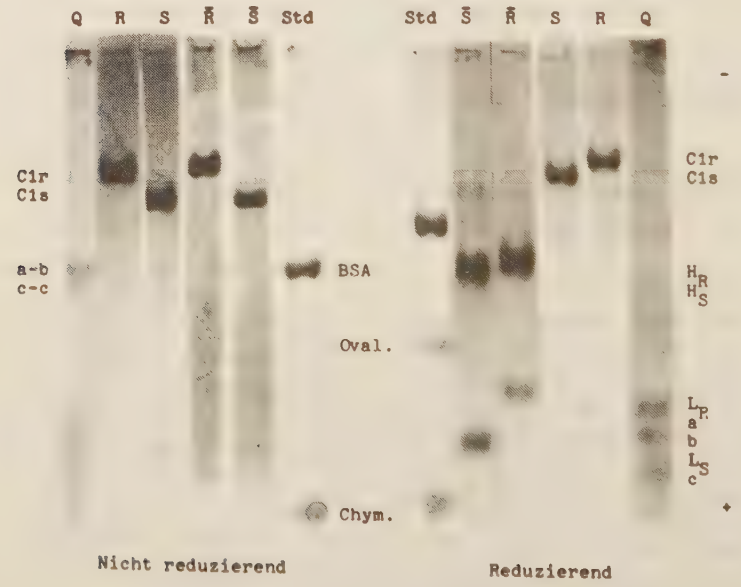

Abb.5: Coomassie Blau gefärbte SDS Gelelektrophorese von nicht reduzierten und reduzierten C1 Untereinheiten ($Q, R, S, \overline{R}, \overline{S}$) und von folgenden Standardproteinen (Std): BSA 67 KD, Ovalbumin 45 KD und Chymotrypsin 20 KD.

Die vom Densitometer ausgezeichneten Absorptionskurven wurden dazu integriert. War die Proteinmenge des Proenzyms und des Enzyms während der Elektrophorese gleich, dann war der Flächeninhalt (F_P) der Absorptionskurve der Proenzymbande genau so groß wie der Flächeninhalt ($F_H + F_L$) der Absorptionskurven der H-Kette und der L-Kette zusammen. Dies bedeutet, daß die Färbung im verwendeten Mengenbereich proportional mit der Proteinmenge zunahm. Aus dem Verhältnis von F_P zu $F_H + F_L$ konnte daher der Grad der Aktivierung berechnet werden.

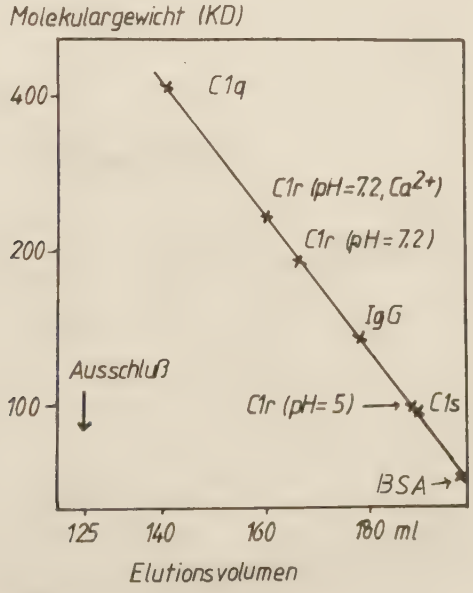

Abb.6: Bestimmung des apparenten Molekulargewichtes der C1 Untereinheiten durch Sephacryl S-300. Als Säulenpuffer wurde eine 0.5 M NaCl Lösung verwendet, die entweder mit 40 mM Phosphat und 1 mM EDTA oder mit 10 mM Tris/Essigsäure und Ca^{2+} auf pH 7.2 gepuffert war.

Die Aggregation der Untereinheiten

Das apparente Molekulargewicht der nativen Proteine wurde durch Gelfiltration nach Eichung der Säule mit humanem Immunoglobulin (IgG) und Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt. Auf der Sephacryl S-300 Säule zeigte Clq ein MG von 400 KD, Clr von 200 KD und Cls von 85 KD. Dies bedeutet, daß Clr bei pH 7.2 als Dimer vorlag. Bei pH 5 dissozierte das Dimer in die Monomere (Abb.6). In Gegenwart von Ca^{2+} eluierte Clr bei 240 KD. Dies deutet darauf hin, daß Clr in Gegenwart von Ca^{2+} die Tendenz hat, seine Gestalt zu verändern.

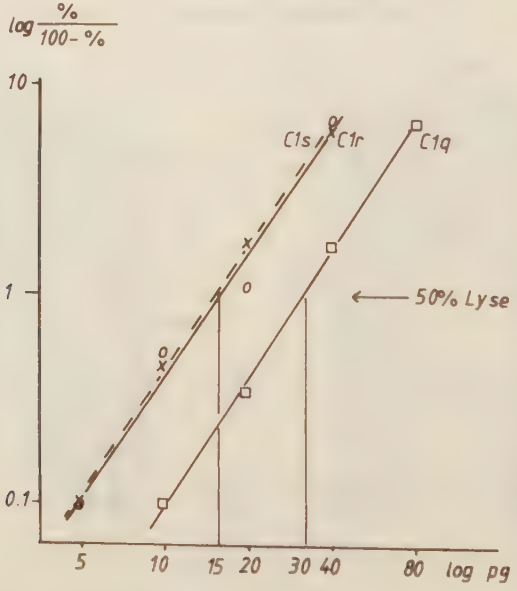

Abb.7: Durch hämolytische Titration wurde bestimmt, wieviel pg Protein der einzelnen Cl Untereinheiten nötig sind, um 50% einer vorgegebenen Erythrocytensuspension zu lysieren. Die Mengen der jeweils ergänzenden Untereinheiten waren 300 pg Clq, 150 pg Clr und 90 pg Cls. Der Wert für 100% Lyse wurde durch hypotone Lyse der Erythrocyten in Wasser bestimmt.

Aktivität der isolierten Untereinheiten

Die Aktivitäten der einzelnen Untereinheiten wurden nach Rekonstitution zu C1 durch hämolytische Titration bestimmt. Es ergab sich dabei, daß bei einem 10 fachen molaren Überschuß der jeweils ergänzenden Untereinheiten 30 pg C1q, 15 pg C1r und 15 pg C1s nötig waren, um soviel C1 zu rekonstituieren, daß 50% von 1.1×10^7 Erythrocyten lysiert werden konnten. Daraus wurde errechnet, daß pro Erythrocyt im Durchschnitt 4 komplette C1 Moleküle zur Verfügung stehen müssen, damit die Hälfte der Zellen lysiert wird (Abb.7).

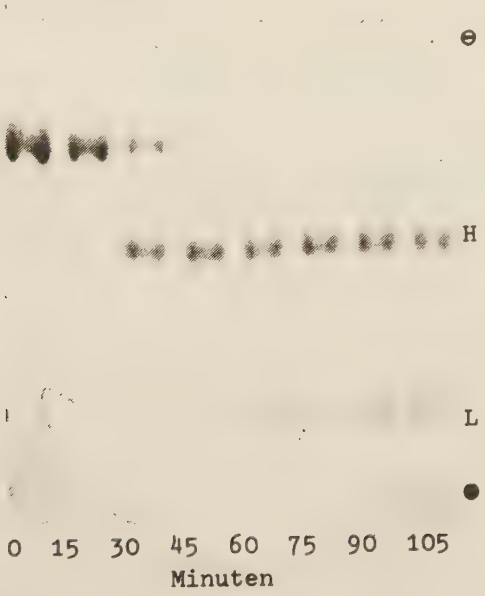

Abb.8: Coomassie Blau gefärbte SDS Gelelektrophorese von reduziertem C1r. C1r wurde vor der Elektrophorese zwischen 0 und 120 Minuten bei 37 °C in Gegenwart von 3 mM EDTA in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 inkubiert.

Spontane C1r Aktivierung

Die isolierten C1 Untereinheiten wurden bei allen folgenden Untersuchungen verwendet. Ziel einer ersten Versuchsreihe war es, zu klären, ob die in der Literatur beschriebene Tendenz des C1r Moleküls, spontan zu aktivieren, eine intramolekulare Eigenschaft des C1r ist oder ob sie durch Proteasen verursacht wird, die als Spurenverunreinigungen noch in der C1r Präparation waren. Dies ist deshalb wichtig, weil nur so festzustellen ist, ob die spontane Aktivierung ein Einkomponentenmodell für die C1r Aktivierung im C1 Molekül ist.

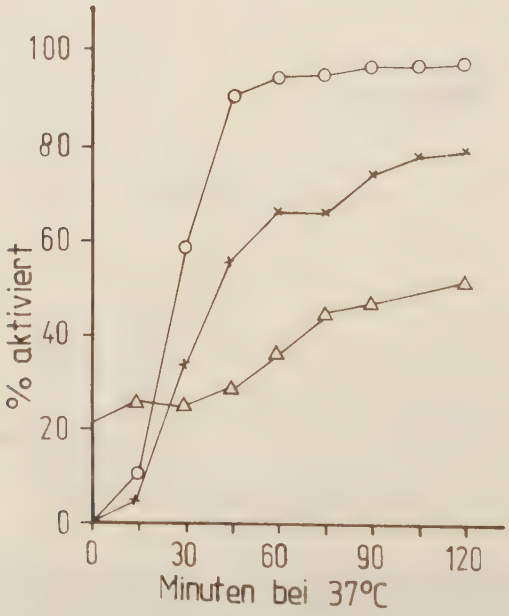

Abb.9: Spontane C1r Aktivierung in Gegenwart von 3 mM EDTA ohne DFP (o———o) und nach 5minütiger (x———x) oder 14stündiger Vorinkubation (Δ———Δ) mit 10 mM DFP bei 22 °C in einem 0.14 M NaCl 50 mM Tris Puffer pH 7.5.

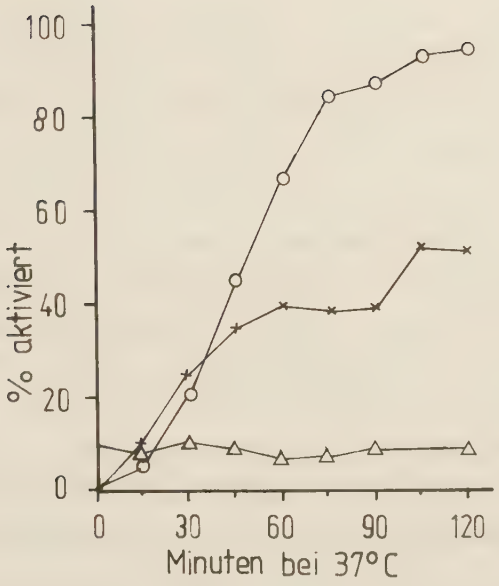

Abb.10: Spontane Clr Aktivierung in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} ohne DFP (o———o) und nach 5minütiger (x———x) oder 14stündiger (Δ———Δ) Vorinkubation mit 10 mM DFP und 22 °C in einem 0.14 M NaCl 50 mM Tris Puffer pH 7.5.

Der Einfluß von Ca^{2+} und EDTA

Das isolierte Clr Proenzym zeigte auf SDS Gelen in Gegenwart von Mercaptoäthanol nur eine Bande (Abb.8, linke Spur). Durch quantitative optische Analyse des Gels wurde sichergestellt, daß in der Clr Proenzymlösung keine meßbaren Mengen aktiviertes Clr vorhanden waren und daß der Anteil der kontaminierenden Proteine unter 5% lag. Wurde dieses Clr Proenzym zwischen 15 und 120 Minuten in einem EDTA-haltigen Puffer bei 37 °C inkubiert und anschließend einer denaturierenden Elektrophorese unterworfen, dann verschwand

die Proenzymbande langsam und gleichzeitig wurden die H- und L-Ketten sichtbar (Abb.8). Nach einer Stunde Inkubationsdauer waren 95% des Clr Proenzyms aktiviert (Abb.9). Auch in einem Ca^{2+}-haltigen Puffer aktivierte Clr während einer 37 ^{o}C Inkubation spontan, aber deutlich langsamer (Abb.10). Nach einstündiger Inkubation waren 65% aktiviert. Diese Ergebnisse zeigen, daß das Clr Molekül die Eigenschaft hat, während einer Inkubation bei 37 ^{o}C spontan zu aktivieren und daß EDTA den Aktivierungsvorgang beschleunigt.

Der Einfluß des DFP

In weiteren Experimenten wurde der Effekt untersucht, den der Serin-Proteaseinhibitor DFP auf die spontane Aktivierung hat. Eine Clr Lösung, die 10 mM DFP enthielt, wurde entweder 5 Minuten oder 14 Stunden bei Raumtemperatur vorinkubiert und dann auf 37 ^{o}C erwärmt. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Abb. 9 und 10 dargestellt. Es wurde gefunden, daß schon ein 5minütiger Kontakt des Clr mit DFP die spontane Clr Aktivierungsgeschwindigkeit reduzierte. 14 Stunden Vorinkubation verstärkten die DFP Wirkung. Dies läßt darauf schließen, daß Serin-Proteasen bei der Aktivierung eine Rolle spielen.

Der Einfluß der H^{+} Ionen

DFP unterdrückte die Spontanaktivierung zwar im Ca^{2+} Puffer total, aber nicht im EDTA Puffer. Deshalb wurde untersucht, ob die im EDTA Puffer trotz DFP auftretende Restaktivierung dadurch beseitigt werden konnte, daß die Clr Lösung auf pH Werte eingestellt wurde, die Serin-Proteasen inaktivieren.

Gewöhnlich haben Serin-Proteasen ein pH Maximum bei 8.5 (53). Clr wurde 30 Minuten bei 37 °C in Ca^{2+} und EDTA Puffern inkubiert, deren pH auf Werte zwischen 5 und 13.4 eingestellt waren (Abb. 11). Im EDTA Puffer stieg die Geschwindigkeit der Aktivierung von pH 5 bis zu einem Maximum bei pH 7. Von pH 7 bis pH 13.2 blieb die Geschwindigkeit gleich. Im Ca^{2+} Puffer verlief die spontane Clr Aktivierung bei pH 8.5 am schnellsten. Bei pH 13.4 war weder im EDTA noch im Ca^{2+} Puffer eine Aktivierung zu beobachten. Dies deutet darauf hin, daß die Spaltung des Clr ein enzymatischer Vorgang ist und nicht durch alkalische Hydrolyse erfolgt. Der pH Grenzwert, an dem keine spontane Clr Aktivierung mehr auftrat, war von der Clr Konzentration abhängig (Abb.11a). Bei einer Konzentration von 0.16 mg/ml war pH 12.9 die obere Grenze für die spontane Clr Aktivierung, bei 0.29 mg/ml pH 13.1 und bei 1 mg/ml pH 13.4.

Die Wirkung des DFP bei verschiedenen pH Werten

Um zu klären, ob auch bei pH 13 Serin-Proteasen die spontane Clr Aktivierung verursachen, wurde die Hemmwirkung des DFP bei verschiedenen pH Werten untersucht. Die Gegenwart von DFP während der Inkubation bei 37 °C hatte den deutlichsten Effekt bei pH 8.5. Es reduzierte im EDTA Puffer die Aktivierung und unterdrückte sie im Ca^{2+} Puffer für 30 Minuten total. Bei pH 13 war der Effekt geringer. Die Ergebnisse zeigen, daß auch außerhalb des Bereichs 6.5 bis 9.5, wo Serin-Proteasen aktiv sind, spontane Aktivierung auftritt, daß aber DFP nur in dem Bereich hemmt, in dem Serin-Proteasen aktiv sind. Dies läßt vermuten, daß außer

den Serin-Proteasen auch noch andere Proteasen spontane C1r Aktivierung verursachen können.

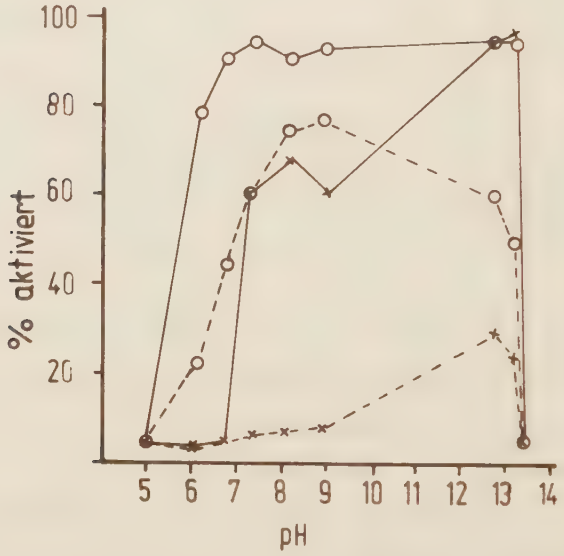

Abb.11: Spontane C1r Aktivierung nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer mit verschiedenen pH Werten. C1r wurde in Gegenwart entweder von 3 mM EDTA ohne (o———o) und mit (o- - -o) 10 mM DFP oder von 3 mM Ca^{2+} ohne (x———x) und mit (x- - -x) 10 mM DFP inkubiert. Die pH Werte um 13 wurden mit NaOH eingestellt.

Abb.11a: Spontane C1r Aktivierung nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer. C1r wurde bei verschiedenen Konzentrationen und verschiedenen pH Werten in Gegenwart von 3 mM EDTA inkubiert.

Die Konzentrationsabhängigkeit

Als nächstes Kriterium zur Frage, ob externe Proteasen die Clr Aktivierung verursachen, wurde untersucht, ob die spontane Clr Aktivierung ein unimolekularer oder ein bimolekularer Prozeß ist. Wenn die spontane Clr Aktivierung ein bimolekularer Prozeß ist, dann müßte sie von der Clr Konzentration abhängig sein und von der Menge eines zugesetzten Fremdproteins.

Tabelle 1

Spontane Clr Aktivierung nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C und pH 7.5 in Gegenwart von 3 mM EDTA.

^{125}J Clr µg/ml	Clr µg/ml	BSA µg/ml	Aktivierung %
2.5	0	0	14.7
2.5	200	0	38.3
2.5	200	2000	35.5
2.5	200	4000	18.1
2.5	200	6000	14.8

Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, daß die Rate der spontanen Aktivierung von ^{125}J markiertem Clr bei einer Konzentration von 2.5 µg/ml während einer 30minütigen Inkubation bei 37 °C geringer war, wenn es alleine inkubiert wurde, als wenn es zusammen mit 200 µg/ml unmarkiertem Clr inkubiert wurde. 6000 µg/ml BSA, die den 202.5 µg/ml zugemischt wurden, reduzierten die Aktivierung von 38.3% auf 14.8 %. Die

Abhängigkeit der spontanen Clr Aktivierung von der Clr Konzentration konnte auch mit kaltem Clr demonstriert werden (Abb.12).

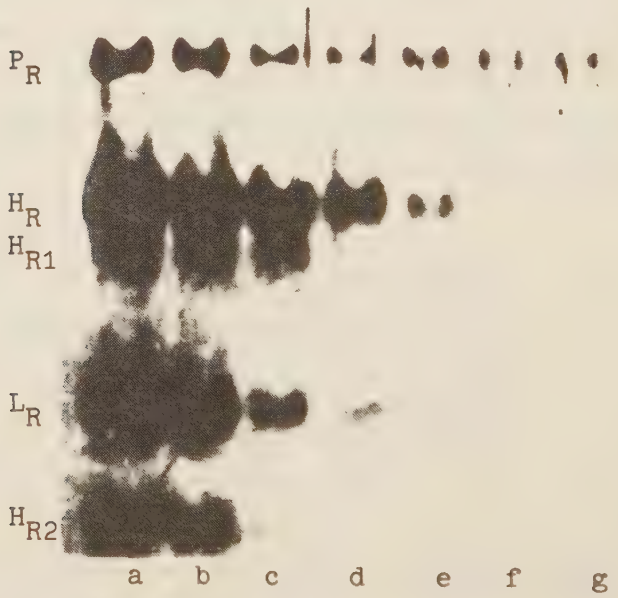

Abb.12: Silber gefärbte Elektrophorese des reduzierten Clr. Clr wurde bei verschiedenen Konzentrationen in Gegenwart von 3 mM EDTA 30 Minuten bei 37 °C in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer inkubiert. a = 750 µg/ml, b = 375 µg/ml, c = 187.5 µg/ml, d = 93.7 µg/ml, e = 46.8 µg/ml, f = 23.4 µg/ml, g = 11.7 µg/ml.

Wurde Clr in einem Konzentrationsbereich zwischen 750 µg/ml und 93.7 µg/ml (a - d) 30 Minuten bei 37 °C inkubiert, so war die je Ansatz prozentual aktivierte Menge ähnlich, wobei etwa 80% des gesamten Clr nach dieser Zeit aktiviert waren. Bei niedrigeren Konzentrationen wurde der prozentuale Anteil des spontan aktivierten Clr geringer. Bei 11.7 µg/ml (g)

konnte keine Aktivierung mehr festgestellt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß der Vorgang der spontanen Aktivierung von der Clr Konzentration abhängt und durch Zugabe von BSA reduziert werden kann. Die Konzentrationsabhängigkeit ist nicht durch einen Zerfall des Clr Dimers in die Monomere zu erklären, weil Clr, das in einer Konzentration von 6 µg/ml auf ein Sephacryl S-300 Molekularsieb aufgetragen wurde, an der gleichen Stelle eluierte wie Clr, das in einer Konzentration von 5 mg/ml aufgetragen wurde (Abb. 6). Dies deutet darauf hin, daß hier ein bimolekularer Prozeß vorliegt.

Die Clr Spaltprodukte

Kontaminierende Proteasen müßten in der Lage sein, ein Clr Molekül nicht nur einmal zu spalten sondern öfter. Deshalb wurde untersucht, ob während der spontanen Clr Aktivierung außer den H- und L-Ketten noch weitere Ketten entstehen. Die Abb.12 zeigt, daß Clr im EDTA Puffer nicht nur an einer Stelle gespalten wird, sondern an mehreren. Die quantitative Auswertung einer Elektrophorese, auf die Clr nach 105minütiger Inkubation bei 37 ^{o}C aufgetragen war, ergab, daß während der Inkubation im EDTA Puffer mehrere Abbauprodukte entstanden. Im Ca^{2+} oder im EDTA Puffer, der 10 mM DFP enthielt, wurden nur die jeweiligen H- und L-Ketten gefunden (Abb. 13). Aus den Flächen der im Densitometer bestimmten Absorptionskurven wurde errechnet, daß die L-Kette stabil blieb, während die H-Kette weiter abgebaut wurde. Ähnliche Ergebnisse wurden erhalten, wenn Clr mit Trypsin verdaut wurde. Trypsin spaltete im EDTA

Puffer die Clr H-Kette öfter als im Ca^{2+} Puffer (54). Dies läßt darauf schließen, daß Clr- unabhängige Proteasen, die eine dem Trypsin ähnliche Spezifität haben, zum Teil für die spontane Clr Aktivierung verantwortlich sind.

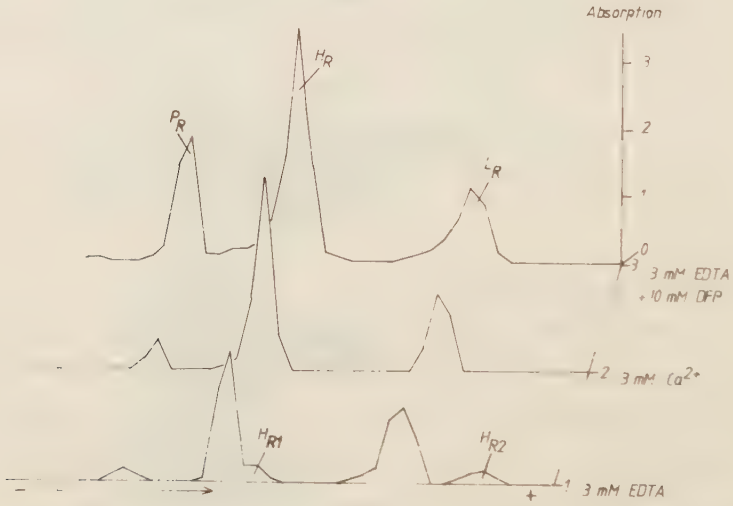

Abb.13: Quantitative optische Analyse von Coomassie Blau gefärbten SDS Elektrophoresen des reduzierten Clr. Clr wurde 105 Minuten bei 37 °C in Gegenwart von 3 mM EDTA (Kurve 1) oder 3 mM Ca^{2+} (Kurve 2) in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 oder in Gegenwart von 3 mM EDTA und 10 mM DFP (Kurve 3) in einem 0.14 M NaCl 50 mM Tris Puffer pH 7.5 inkubiert.

(^{14}C)DFP Bindung

Das Ergebnis, daß DFP die spontane Clr Aktivierung reduzierte oder unterdrückte, ergibt die Möglichkeit, mit Hilfe von (^{14}C)DFP zu suchen, an welche Proteine DFP kovalent bindet. Clr wurde mit 0.2 mM (^{14}C)DFP 14 Stunden

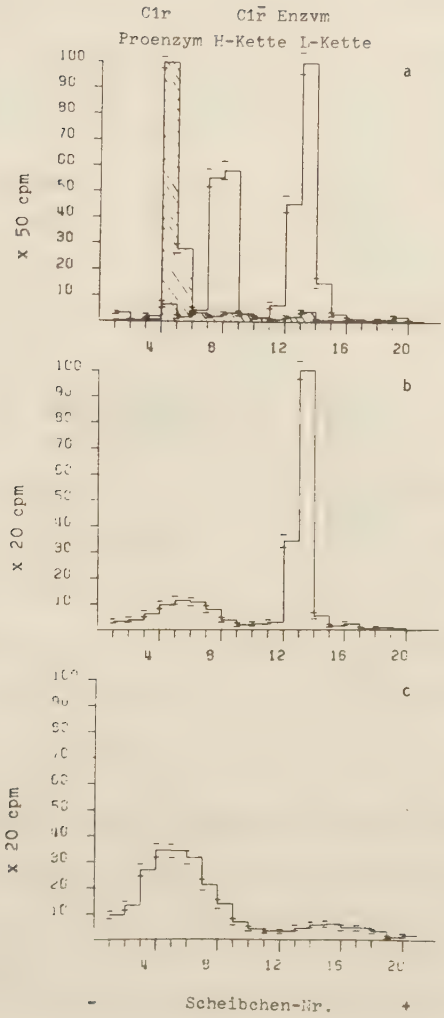

Abb.14: SDS Gelelektrophorese von ^{125}J C1r und C1$\bar{r}$ (a) und von (^{14}C)DFP markiertem C1$\bar{r}$ (b) und C1r (c) unter reduzierenden Bedingungen. Die horizontalen Striche zeigen die ± 3 SD Standardabweichung der radioaktiven Zerfälle in den Scheibchen. Die SD wurde für jedes Scheibchen aus der Quadratwurzel der radioaktiven Zerfälle pro Minute berechnet.

bei Raumtemperatur inkubiert. Dieses $C\bar{1}r$ zeigte auf einem SDS Gel einen scharfen Radioaktivitätsgipfel bei 34 KD (Abb. 14b), welcher der Clr L-Kette entspricht und zusätzlich einen breiten Gipfel im Bereich zwischen 60 und 90 KD. Dies läßt erkennen, daß DFP nicht nur vom Enzymort des $C\bar{1}r$, der in der L-Kette liegt, gebunden wurde , sondern auch noch von anderen Proteinen. Der breite Gipfel entsprach nicht dem übriggebliebenen Clr Proenzym, weil dieses als scharfer Gipfel im Gel wanderte, wie durch ^{125}J markiertes Clr Proenzym im parallelen Gel gezeigt wurde (Abb. 14a). Dies zeigt, daß DFP an aktiviertes $C\bar{1}r$ und an Proteasen bindet, die als Verunreinigungen in der Clr Präparation waren, die aber nichts mit der Clr Funktion zu tun hatten und die auf normalen SDS Gelen färberisch nicht in Erscheinung traten.

Einfluß der Präparationsmethode auf die Stabilität

Da die Ergebnisse zeigten, daß kontaminierende Fremdproteasen den größten Teil der spontanen Clr Aktivierung verursachten, wurde versucht, diese durch Veränderungen der Isolationsmethode zu beseitigen. Eine absolut stabile Clr Präparation konnte allerdings nicht gewonnen werden. Die Geschwindigkeit der Aktivierung aber war von Präparation zu Präparation verschieden (Abb.15). Präparationen, die schneller aktivierten, banden mehr (^{14}C)DFP an die Proteine mit dem Molekulargewicht zwischen 60 und 90 KD. Außerdem war eine höhere Konzentration des Inhibitors NPGB nötig, um die spontane Aktivierung zu verhindern. Relativ stabile Präparationen konnten mit 50 µM NPGB gehemmt werden; für andere wurden bis zu 200 µM NPGB benötigt. Versuche, die

Proteasen zu entfernen, haben gezeigt, daß eine Euglobulinfällung bei pH 6.95 und eine Ammoniumsulfatfällung des S-300 Eluats sich günstig auf die Stabilität auswirkten.

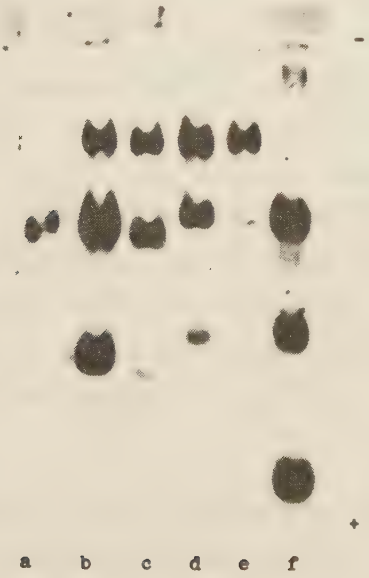

Abb.15: Coomassie Blau gefärbte SDS Gelelktrophorese des reduzierten C1r der Präparationen Nr. 5(a), 10(b), 13(c), 12(d), 11(e) nach 15 Minuten Inkubation bei 37 °C in Gegenwart von 3 mM EDTA in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5. Die Proben (c,d,e) wurden mit Ammoniumsulfat gefällt, die Proben (a,b) wurden nicht gefällt. Die Probe f sind Standardproteine: BSA 67 KD, Ovalbumin 45 KD, Chymotrypsin 20 KD.

Zusammenhang zwischen spontaner C1r Aktivierung und hämolytischer Aktivität.

Wenn DFP nicht an das C1r Proenzym bindet, sondern nur an kontaminierende Fremdproteasen, so sollte die funktionelle

Aktivität des Clr durch DFP Behandlung nicht beeinträchtigt werden. Dies ist in der Tat der Fall, wenn das freie DFP wegdialysiert wird. Wurde Clr in einem Ca^{2+} Puffer mit 10 mM DFP oder 0.2 mM NPGB 30 Minuten bei 37 ^{o}C inkubiert, dann blieb seine Aktivität verglichen zu unbehandeltem Clr voll erhalten, obwohl es während dieser Zeit nicht spontan aktivierte (Tabelle 2). Es kann eingewendet werden, daß DFP oder NPGB reversibel an Clr binden und nur dadurch die Selbstaktivierung gehemmt wird. Bei der weitgehenden Verdünnung von DFP oder NPGB zum hämolytischen Test würde reversibel gebundenes DFP oder NPGB wieder abdissoziieren, was die volle funktionelle Aktivität von Clr erklären würde. Es müßte dann auch wieder zur spontanen Aktivierung des Clr kommen, was jedoch, wie Gelelektrophoresen zeigten, nicht mehr der Fall war.

Im Gegensatz zur Inkubation im Ca^{2+}-haltigen Puffer geht die hämolytische Aktivität des Clr weitgehend verloren, wenn Clr im EDTA Puffer mit DFP und NPGB inkubiert wird, obwohl in Gegenwart von DFP nur eine teilweise und in Gegenwart von NPGB keine spontane Aktivierung beobachtet wurde. Der Verlust der Aktivität war nicht auf eine Wirkung des DFP oder NPGB zurückzuführen, weil Clr, das alleine im EDTA Puffer inkubiert wurde, ebenfalls die Aktivität verlor. EDTA bei einer Konzentration von 1 mM zerstörte aber die hämolytische Clr Aktivität nicht, wenn der Chelierungseffekt des EDTA durch 3 mM Ca^{2+} ausgeglichen wurde. Dies zeigt, daß DFP oder NPGB, wenn sie die spontane Aktivierung hemmen, an keine Stelle des Clr Proenzym binden, die für die

hämolytische Aktivität nötig ist. Der Verlust der Aktivität ist vielmehr darauf zurückzuführen, daß in Abwesenheit von Ca^{2+} die hämolytische Aktivität des Clr durch Erwärmen zerstört wird.

Tabelle 2

Die Wirkung einer 37 °C Inkubation (30 Min.) in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 auf Clr Proenzym.

Puffer	Clr Aktivierung	Cl Rekonstitution	^{125}J Bindung an Cls
EDTA	80%	30%	30%
EDTA + 10mM DFP	30%	30%	20%
EDTA + 0.2 mM NPGB	0%	30%	30%
Ca^{2+}	30%	100%	100%
Ca^{2+} + 10 mM DFP	5%	100%	90%
Ca^{2+} + 0.2 mM NPGB	0%	100%	100%

Der Einfluß der Temperatur

Die Wirkung der Temperatur auf Clr in Gegenwart von EDTA wurde genauer charakterisiert. Temperaturen von 20 °C oder 30 °C reduzierten innerhalb 30 Minuten die hämolytische Clr Aktivität auf 53%, die Temperatur von 37 °C auf 35% . Der Verlust der Aktivität hing von der H^+ Ionenkonzentration ab. Bei 37 °C und pH 5 war Clr stabiler als bei pH 7.5 (Abb. 16). Im alkalischen Bereich nahm die Instabilität zu. Bei pH 13 verlor Clr auch im Ca^{2+} Puffer an Aktivität. Der Zeitverlauf der Inaktivierung zeigt, daß während der ersten

10 Minuten die meiste Aktivität verloren ging (Abb.17). Dies bedeutet, daß die spontane Clr Aktivierung in Gegenwart von EDTA (Abb. 8,9) erst dann auftritt, wenn der größte Teil des Clr bereits irreversibel durch Ca^{2+} Entzug inaktiviert ist.

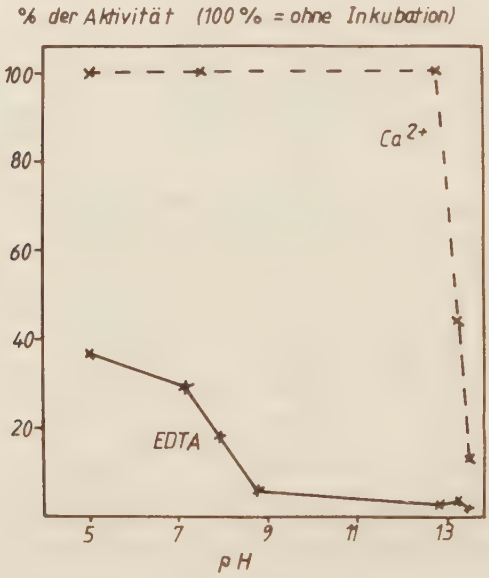

Abb.16: Abnahme der hämolytischen Clr Aktivität nach 30minütiger Inkubation bei 37 °C in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer mit verschiedenen pH Werten in Gegenwart von 3 mM EDTA (x———x) und 3 mM Ca^{2+} (x- - -x).

Der Temperatureinfluß auf die Bindungskapazität von Clr

Die Inkubationsbedingungen, welche zu einem Verlust der hämolytischen Aktivität führten, zerstörten die Fähigkeit des Clr, zusammen mit Clq und Cls in Gegenwart von Ca^{2+} ein Cl Makromolekül zu formen. ^{125}J Cls konnte zusammen mit Clq und Clr nicht an EA-Zellen bebunden werden, wenn das Clr 30

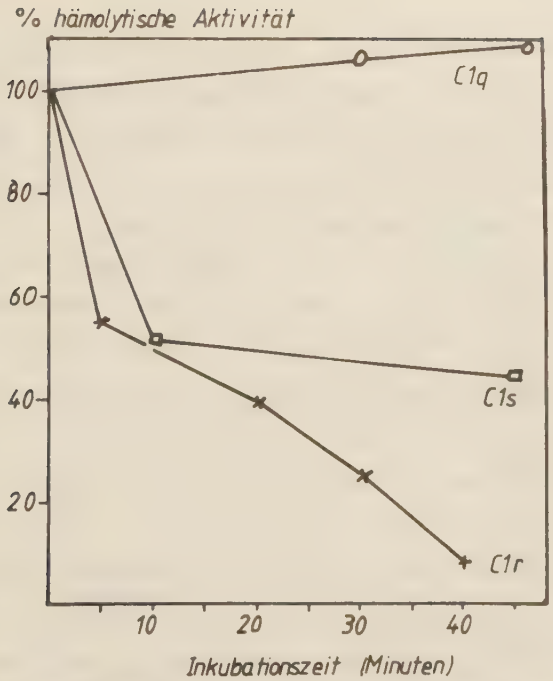

Abb.17: Veränderung der hämolytischen Aktivitäten der C1 Untereinheiten C1q, C1r und C1s nach 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in Gegenwart von 3 mM EDTA in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5.

Minuten bei 37 °C in einem EDTA-haltigen Puffer vorinkubiert war. Im EDTA Puffer bei 37 °C vorinkubiertes ^{125}J C1r konnte auch nicht mehr an Sepharose 4B gekoppeltes C1s gebunden werden (Tabelle 2). Der oben beschriebene Verlust der hämolytischen C1r Aktivität ist also darauf zurückzuführen, daß in Abwesenheit von Ca^{2+} Ionen durch erhöhte Temperatur (>20 °C) die Fähigkeit des C1r Moleküls zerstört wurde, an die übrigen Untereinheiten zu binden. Die proteolytische Eigenschaft des aktivierten $C1\bar{r}$, seinerseits C1s zu spalten, blieb aber während einer 30minütigen Inkubation in einem

EDTA-haltigen Puffer bei 37 °C vollständig erhalten (Abb. 18), wie sich daraus ergibt, daß das neu aktvierte $C1\bar{s}$ das Substrat ALTEE spaltet. ALTEE kann nur von $C1\bar{s}$ nicht aber vom $C1\bar{r}$ gespalten werden.

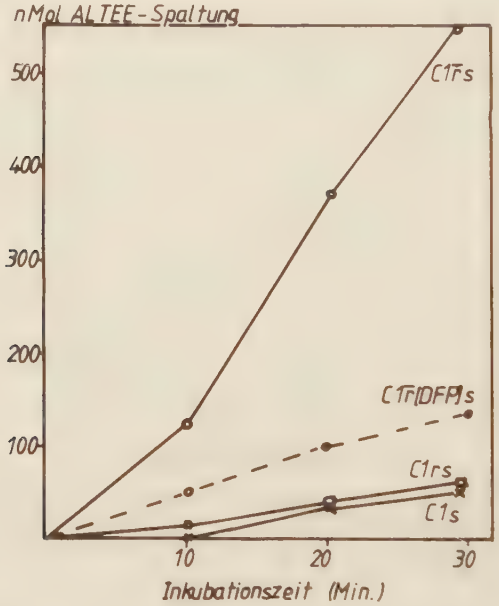

Abb.18: Esteraseaktivität des Cls gegen ALTEE (x———x) sowie von Cls in Gegenwart von Proenzym Clr (□ ——— □), aktiviertem $C1\bar{r}$ (o———o) und aktivierten DFP inhibiertem $C1\bar{r}$ (o- - -o). Clr wurde durch 30 Minuten Inkubation bei 37 °C in Gegenwart von 3 mM EDTA in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 aktiviert.

Die Wirkung der Temperatur auf Cls und Clq

Parallel zum Clr wurde die Stabilität von Clq und Cls in Gegenwart von Ca^{2+} und EDTA untersucht. Dabei wurde gefunden, daß auch die hämolytische Aktivität des Cls innerhalb von 10 Minuten bei 37 °C abnahm, wenn es in

Gegenwart von EDTA inkubiert wurde. Die Aktivität des Clq dagegen wurde nicht reduziert, wenn es im EDTA Puffer bei 37 ^{o}C 45 Minuten inkubiert wurde (Abb.17). In Gegenwart von Ca^{2+} waren beide Moleküle stabil.

Ergebnis der Versuchsserie

Zusammenfassend kann über diese Versuchsserie gesagt werden: Clr und Cls benötigen bei Temperaturen über 20 ^{o}C Ca^{2+}, um ihre aktive Konformation aufrecht zu erhalten. Ist diese Struktur, welche wahrscheinlich in der H-Kette liegt, durch Ca^{2+} Entzug irreversibel zerstört, dann verlieren die Proteine ihre Bindefähigkeit und werden gleichzeitig leichter angreifbar für Proteasen, die wie Trypsin entweder zugegeben werden können oder in Spuren die Präparationen verunreinigen. Da es nicht gelang, vollständig stabile Clr Präparationen zu erhalten, kann zwar eine mögliche intramolekulare Clr Aktivierung nicht ganz ausgeschlossen werden. Die durchgeführten Versuche zeigen aber deutlich, daß die spontane Aktivierung im pH Bereich 5 bis 9, welcher von physiologischen Interesse ist, auf kontaminierende Proteasen zurückzuführen ist.

Die Clr Aktivierung im Cl Molekül

Isolierung einer Zwischenstufe

Da also die spontane Clr Aktivierung kein günstiges Modell ist, um die Vorgänge zu studieren, die während der Clr Aktivierung im Cl Molekül ablaufen, wurde in einer zweiten Versuchsreihe das ganze Cl Makromolekül untersucht. Dabei wurde versucht, die enzymatisch aktiven Zentren eines

Proteins mit einem Inhibitor zu blockieren und dann die Bindungsstelle des Inhibitors zu suchen. NPGB ist ein Proteaseinhibitor, von dem in der Literatur berichtet wurde, daß er sowohl die spontane Clr Aktivierung als auch die Clr Aktivierung im Cl Molekül hemmt (33-36). Der Befund, daß NPGB (0.2 mM/ml) die Cl Aktivierung hemmt, wenn sie durch aggregiertes IgG stimuliert wird, konnte reproduziert werden (Abb. 19). Abb. 19 zeigt, daß Clrs, das in Gegenwart von NPGB 30 Minuten bei 37 ^{o}C inkubiert wurde, auf einem SDS Gel (zweite Spur von oben) an der typischen Stelle der nicht aktivierten Moleküle bandierte, während es nach Inkubation ohne NPGB verschwunden , d.h. in die H- und L-Ketten gespalten war, welche von der schweren Kette des IgG Moleküls und von den a, b und c Ketten des Clq überlagert sind (3. Spur von oben). Die NPGB Inhibition auf aktiviertes $\overline{Cl}$ innerhalb des Cl Moleküls war nicht sehr ausgeprägt. Wurde nämlich Cl, das an Antikörper beladenen Erythrocyten gebunden war, durch acht Minuten Inkubation bei 37 ^{o}C aktiviert, so wurde in Gegenwart von 0.2 mM NPGB nur eine geringe Hemmwirkung beobachtet (Abb. 20). Die Hemmung konnte auch dadurch nicht verbessert werden, daß rekonstituiertes Cl mit NPGB vorinkubiert wurde. Dies läßt vermuten, daß NPGB entweder mehrere Minuten benötigt, um an die entscheidende Stelle zu binden, oder aber, daß NPGB die Aktivierung des zellgebundenen Cl nicht hemmt.

Stabile NPGB Bindung an aktiviertes $\overline{Cl}$

In einem weiteren Schritt wurde nun versucht, die Stelle zu finden, an die NPGB bindet, wenn es die Cl Aktivierung

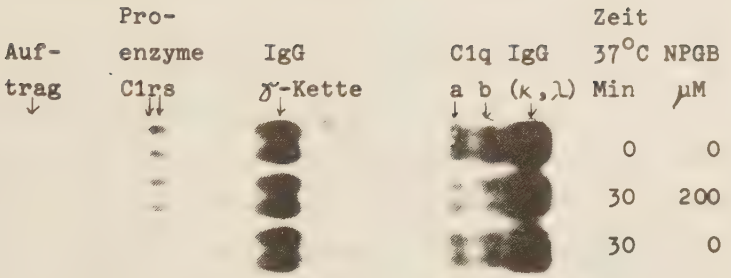

Abb.19: Silber gefärbte SDS Gelelektrophorese des C1 Makromoleküls und des aggregierten IgG unter reduzierenden Bedingungen. Die Proteine wurden bei 37 °C in Gegenwart von Ca^{2+} in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 inkubiert. NPGB hemmt die C1 Aktivierung (2. Spur).

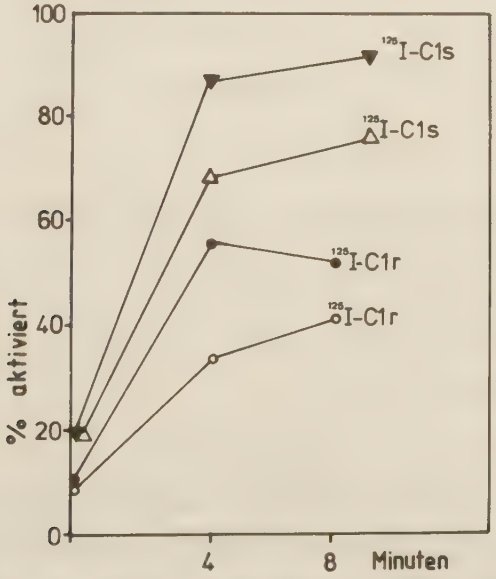

Abb.20: C1 Aktivierung auf EA-Zellen. ^{125}J C1s wurde mit kaltem C1r und C1q zu C1 rekonstituiert und dann ohne (▲———▲) und mit 0.2 mM (Δ———Δ) NPGB durch 37 °C Inkubation aktiviert. In einem parallelen Ansatz wurde ^{125}J C1r mit kaltem C1s und C1r zu C1 rekonstituiert und ohne (●———●) und mit 0.2 mM NPGB aktiviert (o———o). Die Aktivierung wurde aus der Menge der H- und L-Ketten nach SDS Gelelektrophorese der mit 10 mM EDTA von den Zellen abdissoziierten ^{125}J C1r und ^{125}J C1s Moleküle bestimmt.

hemmt. Die einzelnen Untereinheiten wurden deshalb bei einer Konzentration von 1 mg/ml mit 0.2 mM NPGB in Gegenwart von Ca^{2+} 30 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Dann wurden sie um den Faktor 10000 verdünnt, um die Konzentration des NPGB auf nicht hemmende Werte herabzusetzen und um in den richtigen Bereich der Konzentrationen der C1 Untereinheiten für den hämolytischen Test zu kommen. Die Aktivität dieser Verdünnungen wurde nach Rekonstitution zu C1 durch hämolytische Titration bestimmt, wobei zwischen dem Zeitpunkt der Verdünnung und der für die C1 Aktivität entscheidenden Aktivierung des C2 Moleküls im Verlauf des hämolytischen Testes 30 Minuten vergingen. Dabei wurde gefunden, daß nach der Vorinkubation nur die Aktivität des aktivierten $C1\bar{s}$ durch NPGB spezifisch reduziert werden konnte, aber nicht die Aktivität des aktivierten $C1\bar{r}$ oder der Proenzyme C1r und C1s oder der C1q Untereinheit. Dies schließt zwar nicht aus, daß NPGB nicht auch kovalent an diese C1 Untereinheiten binden könnte, es zeigt aber, daß NPGB nur bei aktiviertem $C1\bar{s}$ für längere Zeit (30 Minuten) kovalent gebunden bleibt.

NPGB Wirkung auf aktiviertes $C1\bar{r}$

NPGB ist ein kovalent bindender, aber im Gegensatz zu DFP sehr labiler Inhibitor. Er wird von vielen Proteasen, mit denen er reagiert, sehr schnell wieder abgespalten (58). Es wurde deshalb untersucht, ob die Gegenwart von 50 µM NPGB die proteolytische Aktivität des aktivierten $C1\bar{r}$ gegenüber C1s hemmt. Dies ist in der Tat der Fall.

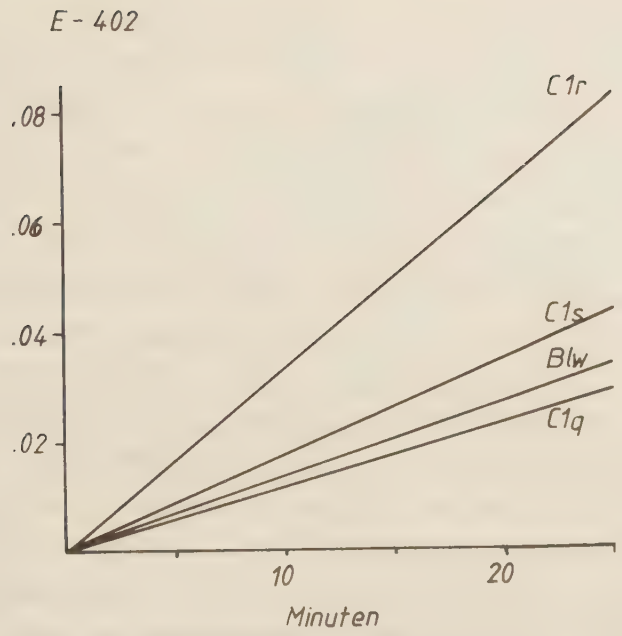

Abb.21: NPGB (50 µM) Hydrolyse in wässriger Lösung bei pH 7.5 ohne Protein (Blw) und in Gegenwart von 25 µg/ml C1r, 25 µg/ml C1s und 50 µg/ml C1q.

NPGB Hydrolyse

Da also aktiviertes $C1\overline{r}$ von NPGB gehemmt wird, ohne daß NPGB für meßbare Zeit kovalent gebunden wird, wurde untersucht, ob die Bindungszeit des NPGB so kurz ist, daß NPGB wie ein Substrat abgebaut wird. Wurde 50 µM NPGB in wässriger Lösung inkubiert, dann wurde der Ester langsam hydrolysiert, d.h. es wurde im Photometer meßbares p-Nitrophenol freigesetzt (Abb. 21). Die Geschwindigkeit der Esterspaltung wurde geringfügig erhöht, wenn der Lösung C1s Proenzym oder C1s Enzym zugesetzt wurde, während bei einer äquimolaren Menge

Clq keine über den Blindwert hinausgehende Spaltung beobachtet wurde. Die gleiche Menge Clr erhöhte dagegen die NPGB Hydrolysegeschwindigkeit deutlich. Die Clr Wirkung war aber davon unabhängig, ob Proenzym Clr oder aktiviertes $C1\bar{r}$ oder aktiviertes, DFP inhibiertes $C1\bar{r}$ zugegeben wurde. Dies zeigt, daß NPGB nicht durch den Enzymort des Clr gespalten wird, sondern wahrscheinlich durch nukleophile Aminosäuren auf der Oberfläche des Clr. Diese Clr Wirkung wurde aber nicht beobachtet, wenn denaturiertes Clr zugegeben wurde. Hier war die Esterspaltung geringer als im Kontrollexperiment ohne Protein. Sie war vergleichbar mit der NPGB Hydrolyse in Gegenwart von Clq. Während der Versuche wurde beobachtet, daß Clq Lösungen trüb wurden, wenn 50 µM NPGB zugemischt wurde. Dies deutet darauf hin, daß Clq in Gegenwart von geringen Mengen NPGB unlöslich wird.

Ergebnis der NPGB Hemmversuche

Zusammenfassend kann über diese Versuchsreihe gesagt werden: NPGB bindet in stabiler Weise nur an aktiviertes $C1\bar{s}$ kovalent. Es hemmt aber auch die proteolytische Aktivität des aktivierten $C1\bar{r}$. Es hemmt außerdem die Clr Aktivierung im Cl Molekül. An welche Enzymstelle bei diesem Vorgang jedoch NPGB bindet, konnte nicht gefunden werden. Es ist aber auf Grund dieser Versuche nicht ganz unwahrscheinlich, daß der eigentliche Grund für die beobachtete Hemmung der Cl Aktivierung (Abb.19) eine unspezifische Veränderung des Clq ist, weil dieses in freier Lösung nach Zugabe von NPGB ausfällt.

Konformationsänderungen während der C1 Komplexbildung und der C1 Aktivierung.

Da mit NPGB kein diskreter Zwischenzustand im intramolekularen Prozess der C1 Aktivierung gefunden werden konnte, wurde versucht, Konformationsänderungen der C1 Untereinheiten während der Aktivierung nachzuweisen. Eine bekannte Methode, Konformationsänderungen von Proteinen nachzuweisen, ist, diese unter verschiedenen Bedingungen mit ^{125}J zu markieren. Die C1 Untereinheiten wurden deshalb entweder alleine oder in verschiedenen Kombinationen in Gegenwart von EDTA oder Ca^{2+} in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 mit ^{125}J markiert.

C1s Markierung

^{125}J markiertes C1s Proenzym zeigte auf einem SDS Gel unter reduzierenden Bedingungen eine größere Bande bei 85 KD und 2 kleinere Banden bei 60 KD (H-Kette) und 25 KD (L-Kette). Dies zeigt, daß während der Isolation und der Markierung weniger als 15% der C1s Moleküle aktiviert wurden (Abb.22). Aktiviertes $C1\bar{s}$ wurde auf einem SDS Gel in 2 Banden zerlegt, eine größere Bande bei 60 KD (H-Kette) und eine kleinere bei 25 KD (L-Kette). Die Verteilung des ^{125}J Markers zwischen der H- und der L-Kette war weitgehend davon unabhängig, ob aktiviertes $C1\bar{s}$ oder zymogenes C1s markiert wurden. In Gegenwart von 5 mM EDTA wurde 95% des Markers in die H-Kette eingebaut, wenn C1s als Proenzym markiert wurde und 90%, wenn es als Enzym markiert wurde. Wenn die Markierung in Gegenwart von Ca^{2+} durchgeführt wurde, erniedrigte sich der H-Ketten Marker im Proenzym auf 90% und im Enzym auf 80%.

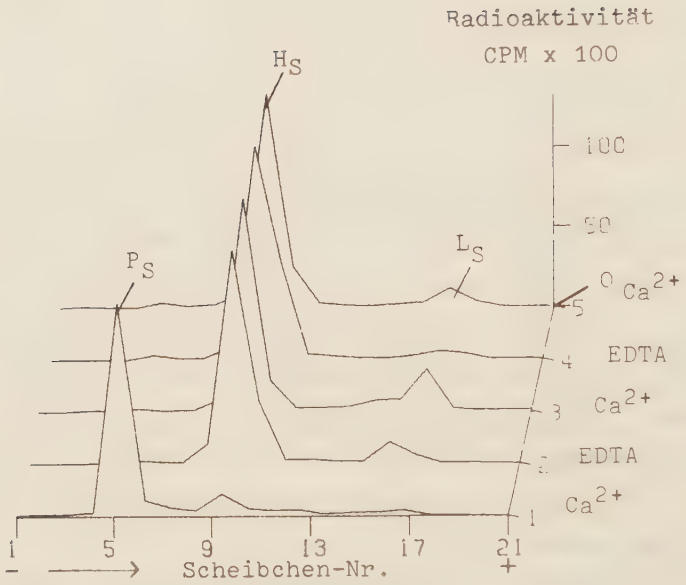

Abb.22: SDS Gelelektrophoresen des ^{125}J Cls Proenzym (1) und Enzym (2-5). Das $Cl\bar{s}$ der Kurven 2 und 3 wurde nach der Aktivierung markiert, das $Cl\bar{s}$ der Kurven 4 und 5 wurde vor der Aktivierung markiert.

Clr Markierbarkeit

^{125}J markiertes Clr zeigte auf dem SDS Gel eine größere Bande bei 90 KD und zwei kleinere Gipfel bei 60 KD (H-Kette) und 35 KD (L-Kette) (Abb.23). Daraus wurde errechnet, daß während der Behandlung 8% des Clr aktiviert wurden. 50% des Markers wurden in der H-Kette gefunden, wenn Clr Proenzym in Gegenwart von Ca^{2+} markiert wurde. In Gegenwart von EDTA wurden 60% ^{125}J in die schwere Kette inkorporiert. Nur 10% des Markers wurden dagegen in die H-Kette eingebaut, wenn aktiviertes Clr markiert wurde. Dieser ^{125}J Einbau war

unabhängig von der Gegenwart des Ca^{2+} oder des EDTA. Das Ergebnis zeigt, daß die Markierbarkeit der H-Kette mit ^{125}J durch die Aktivierung auf ein Fünftel reduziert wurde.

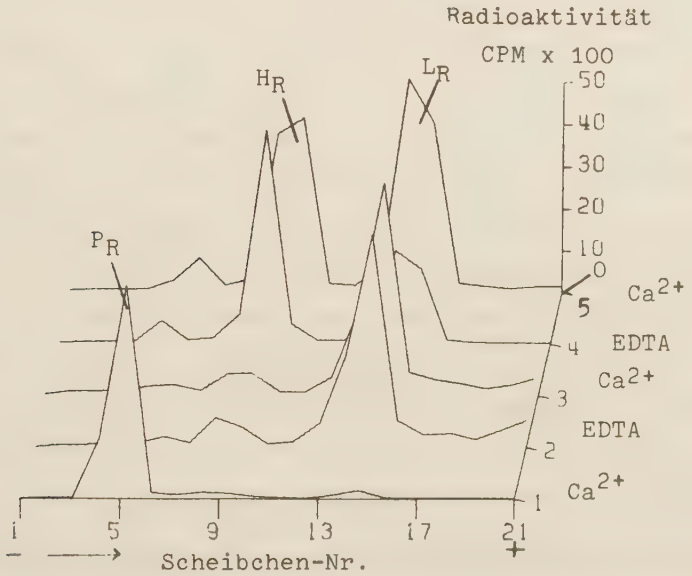

Abb.23: SDS Gelelektrophoresen des ^{125}J C1r Proenzym (1) und Enzym (2-5). Das $C1\bar{r}$ der Kurven 2 und 3 wurde vor der Aktivierung markiert, das $C1\bar{r}$ der Kurven 4 und 5 nachher.

Der Einfluß von C1q und C1s auf die Markierbarkeit von C1r

In weiteren Experimenten wurde untersucht, ob durch Verändern der Puffer während der Markierung auch das Markierungsverhalten des C1r Proenzyms geändert werden konnte. Unterschiedliche Ca^{2+} Konzentrationen zwischen 3 und 20 mM in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 hatten keinen Einfluß auf das Markierungsverhalten. Ein ähnliches Ergebnis wurde erzielt, wenn die EDTA Konzentration zwischen

3 und 20 mM variiert wurde. Dies zeigt, daß der Unterschied zwischen dem Markierungsverhalten in Ca^{2+} und EDTA durch höhere Konzentrationen nicht mehr verstärkt werden konnte. Dagegen hatte die gleichzeitige Gegenwart von Clq und Cls im Reaktionsgemisch während der Markierung einen deutlichen Einfluß auf den ^{125}J Einbau in das Clr Proenzym. Die Gegenwart von Cls erniedrigte den ^{125}J Einbau in die H-Kette des Clr Proenzym auf 42 %, die Gegenwart von Clq auf 36% und die Gegenwart von Clq und Cls auf 25 %. Der Einfluß der Untereinheiten auf Clr war unabhängig davon, ob im Ansatz Ca^{2+} oder EDTA vorhanden waren. Dies zeigt, daß die Clr Untereinheiten auch ohne feste Komplexbildung miteinander interagieren und daß diese Interaktion die Markierbarkeit des Clr Proenzyms derjenigen des Enzyms anglich, obwohl Clr noch nicht gespalten war, wie durch die anschließende Elektrophorese gezeigt wurde.

Der Einfluß von Clr und Cls auf die Markierbarkeit von Clq

Die spezifischen Radioaktivitäten aller markierten Proteinproben waren ähnlich (0.8 mCi/mg Protein), unabhängig davon, ob sie nur eine Untereinheit enthielten (Clq, Clr, Cls) oder ob sie verschiedene Kombinationen der Cl Untereinheiten enthielten (Clqr, Clqs, Clrs, Clqrs). Obwohl die spezifischen Aktivitäten aller Gesamtproben ähnlich waren, änderten sich die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Untereinheiten bei Mischungen verschiedener Untereinheiten. Wenn Clq zusammen mit Clr (molares Verhältnis 1:2), Cls (molares Verhältnis 1:4) oder Clrs

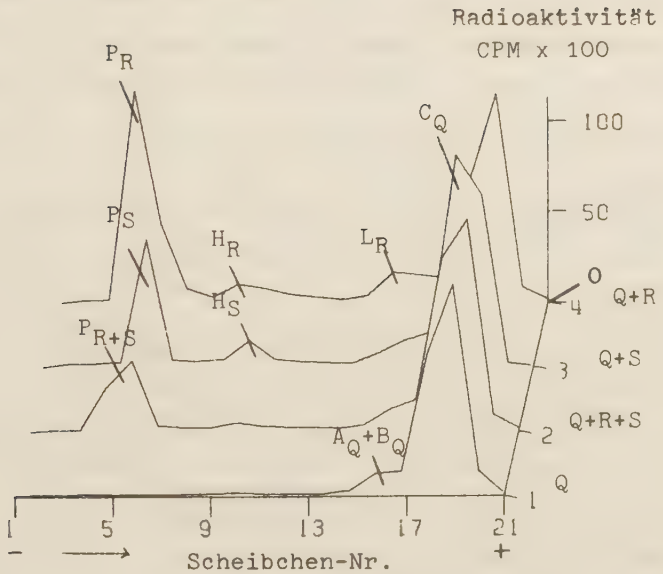

Abb.24: SDS Gelelektrophoresen des ^{125}J Clq. Clq wurde in Gegenwart von Ca^{2+} alleine markiert (1), oder zusammen mit äquivalenten Mengen Clr (4), Cls (3) und Clrs (2).

Komplexen (molares Verhältnis 1:1) in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} markiert wurden, dann wurden 50%, 70% und 75% des Markers in das Clq Molekül inkorporiert (Abb. 24). Dies entspricht einem Anstieg der spezifischen Clq Radioaktivität gegenüber dem Wert bei alleiniger Clq Markierung auf das 1.4 und 1.5 fache, während die spezifische Aktivität des Cls oder Clrs auf das 0.6 und 0.5 fache absank. Das Ergebnis zeigt, daß die Interaktion der Cl Untereinheiten die Markierbarkeit des Clq erhöht. Um die Interaktion der Untereinheiten zu verstärken und den Grad der spezifischen Clq Markierung noch weiter zu erhöhen, wurden Clq, Clr und

Cls in Gegewart von Ca^{2+} in einem molaren Verhältnis von 1:2:4 markiert. Dabei wurden 58% des Markers in das Clq Molekül eingebaut, obwohl die Proteinmasse des Clq nur 33% betrug. Dies entspricht einem 1.7 fachen Anstieg der spezifischen Radioaktivität des Clq.

Veränderung der Markierbarkeit durch Komplexbildung

Das gleiche Ergebnis (58% ^{125}J Einbau bei einem Proteinanteil von 33%) wurde erhalten, wenn das Experiment in Gegenwart von EDTA durchgeführt wurde. Dies zeigt, daß der Anstieg der Clq Radioaktivität vorrangig auf eine erhöhte Reaktionsfähigkeit des Clq zurückzuführen ist und nicht wesentlich darauf, daß durch die Ca^{2+}-bedingte Komplexbildung markierbare Teile der Clr und Cls Moleküle, die in das Innere des Cl Makromoleküls kamen, für die ^{125}J Moleküle nicht mehr zugänglich waren. Eine Veränderung der Markierbarkeit wurde für den Clrs Komplex gefunden, der sich in Gegenwart von Ca^{2+} bildet. Wenn Cls in Gegenwart von EDTA zusammen mit gleichen Mengen Clr markiert wurde, inkorporierte es 50% des Markers. Wenn das gleiche Experiment in Gegenwart von Ca^{2+} durchgeführt wurde, dann wurden zwischen 35% und 40% des Markers im Cls Molekül gefunden. Die Ca^{2+} bedingte Verringerung der Cls Markierung war durch eine Verringerung der H-Ketten Markierbarkeit bedingt. Dies läßt vermuten, daß die Clrs Komplexbildung über die H-Ketten erfolgt. Die in Abb.22 beobachtete Abnahme der Cls H-Ketten Markierung in Gegenwart von Ca^{2+} kann ebenfalls dadurch interpretiert werden, daß bei der Cls Dimerbildung sich die H-Ketten zusammenlagern.

Das wesentliche Ergebnis dieser Versuchsreihe ist, daß Clr sein Markierungsverhalten bei Aktivierung deutlich ändert und Clq in Gegenwart von Clrs besser markiert wird, unabhängig davon, ob Ca^{2+} oder EDTA im Markierungsmedium vorhanden ist. Die Markierung von Cls ist dagegen von den äußeren Bedingungen weitgehend unabhängig. Das veränderte Markierungsverhalten läßt darauf schließen, daß bestimmte Aminosäuren (Tyrosin oder Histidin) während der Komplexbildung und während der Aktivierung entweder ihre Position relativ zur Moleküloberfläche oder ihren Dissoziationsgrad ändern (56). Es war nun von Interesse, ob die Aminosäuren, deren Markierungsverhalten nach der Aktivierung verändert war, auch beim Aktivierungsvorgang eine direkte Rolle spielen. Deshalb wurde die Aktivität der markierten Proteine untersucht. Da bei der ^{125}J Markierung höchstens 4% der vorhandenen Proteine markiert wurden, konnte nur geprüft werden, ob die markierten Clr Moleküle anders aktivierten als die unmarkierten.

Die Aktivität des ^{125}J Clr

Wurden ^{125}J Clr zusammen mit Clq und Cls und ^{125}J Cls zusammen mit Clq und Clr in parallelen Ansätzen auf EA Zellen unter gleichen Bedingungen aktiviert, so wurde gefunden, daß ^{125}J Cls im zellgebundenen Cl deutlich schneller aktiviert wurde als ^{125}J Clr (Abb.25). Als Vergleich wurde kaltes Clr im Cl Molekül durch Zugabe von aggregiertem IgG bei 37 ^{o}C aktiviert. Dieses Cl Molekül wurde nach verschiedenen Zeiten der Inkubation auf einem SDS Gel analysiert. Auf dem mit Silber gefärbten Gel war zu se-

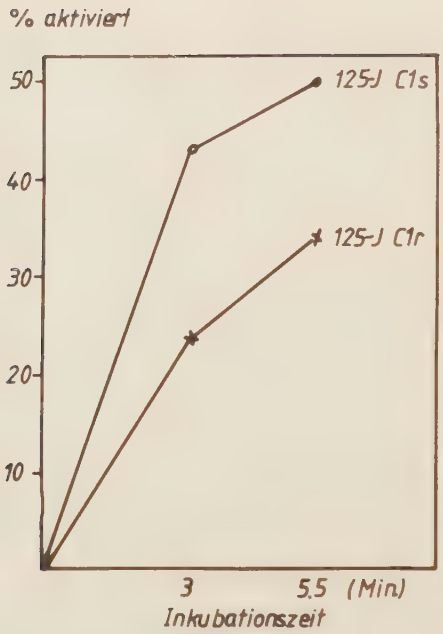

Abb.25: C1 Aktivierung auf EA-Zellen. In parallen Ansätzen wurde ^{125}J C1s mit C1r und C1q und ^{125}J C1r mit C1s und C1q in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} zu C1 rekonstituiert, an EA Zellen gebunden und durch Inkubation bei 37 °C aktiviert.

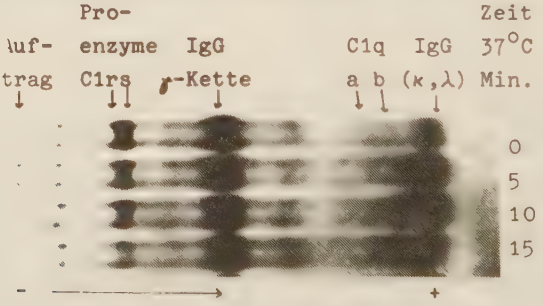

Abb.26: Silber gefärbte SDS Gelelektrophorese unter reduzierenden Bedingungen des C1 Makromolekül, das zusammen mit aggregiertem IgG in Gegenwart von 3mM Ca^{2+} bei 37 °C inkubiert wurde. Die C1r Proenzymbande verschwindet schneller als die C1s Proenzymbande.

hen, daß zunächst Clr aktiviert wurde und dann Cls vom aktivierten $\overline{ClF}$ (Abb.26). Dies deutete darauf hin, daß ^{125}J Clr zwar in das Cl Molekül eingebaut wurde, daß aber der Prozeß der Aktivierung verlangsamt wurde.

Einfluß der Nitrierung auf die hämolytische Aktivität der Cl Untereinheiten

^{125}J wird üblicherweise in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe des Tyrosin eingebaut. Eine Wirkung der ^{125}J Markierung auf die hämolytische Aktivität der Cl Untereinheiten konnte wegen des geringen Anteils der markierten Proteine an der Gesamtheit aller vorhandenen Proteine (4%) nicht untersucht werden. Deshalb wurden die Cl Untereinheiten mit 10 mM Tetranitromethan in einem 0.14 M NaCl 10 mM Tris Puffer pH 7.5 in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} behandelt. Bei dieser Behandlung werden beim überwiegenden Teil aller Proteinmoleküle die dissozierten Tyrosine, die sich jeweils an der Oberfläche befinden, in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe nitriert (55). Nach der Nitrierung der Untereinheiten Clq, Clr, und Cls wurde ihre Aktivität durch Cl Rekonstitution und hämolytische Titration bestimmt. Dabei wurde gefunden, daß durch diese chemische Modifikation die Cls Aktivität kaum verändert wurde. Es wurden 80% bis 100% der Ausgangsaktivität wieder gefunden. Die Aktivitäten der Clr und Clq Untereinheiten dagegen waren auf 20% - 40 % reduziert. Um zu unterscheiden, ob die Reduktion der Aktivität durch Zerstörung der Fähigkeit von Clq und Clr zur Cl Komplexbildung oder durch eine Blockierung der intramolekularen Aktivierung erfolgte, wurde nitriertes Clq mit nicht nitriertem Clr und

Cls in Gegenwart von Ca^{2+} zu Cl rekonstituiert. Dabei waren entweder Clr oder Cls mit ^{125}J markiert. Die Cl Komplexbildung und die Fähigkeit des gebildeten Komplexes, an EA-Zellen zu binden, war auch nach der Nitrierung des Clq vorhanden. Dies zeigt, daß die Nitrierung der Tyrosinreste im Clq den Verlust der hämolytischen Clq Aktivität dadurch bewirkt, daß sie den intramolekularen Aktivierungsvorgang hemmt, und nicht dadurch, daß sie die Fähigkeit des Clq zerstört, in den Cl Komplex zu inkorporieren.

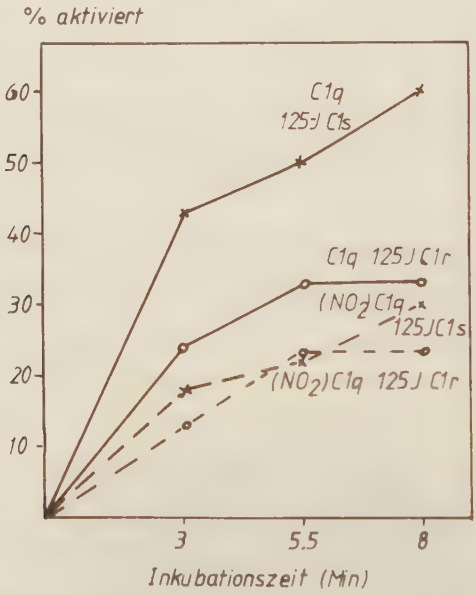

Abb.27: Cl Aktivierung auf EA Zellen mit Clq und NO_2-Clq. ^{125}J Cls wurde mit Clr und Clq (x———x) bzw Clr und NO_2-Clq (o———o) in Gegenwart von 3 mM Ca^{2+} in einem 60 mM NaCl, 180 mM Sucrose und 5 mM Na-Barbiturat Puffer pH 7.4 zu Cl rekonstituiert, im gleichen Puffer an die Zellen gebunden und durch 37 °C Inkubation aktiviert. Im parallelen Ansatz wurde ^{125}J Clr mit Cls und Clq (x- - -x) bzw Cls und NO_2-Clq (o- - -o) zu Cl rekonstituiert und auf EA Zellen aktiviert.

Nitrierung hemmt Clq Aktivierungsaktivität

In einem weiteren Experiment wurde die mangelnde Fähigkeit des nitrierten Clq, die Cl Aktivierung zu induzieren, direkt getestet. $Clq(NO_2)$ wurde zusammen mit Clr und Cls in Gegenwart von Ca^{2+} an sensibilisierte Schaferythrocyten gebunden und dann bei 37 °C aktiviert. Im Cl Molekül, das nitriertes Clq enthielt, wurden sowohl ^{125}J Clr als auch ^{125}J Cls langsamer aktiviert als in den parallelen Ansätzen, die unbehandeltes Clq enthielten (Abb.27). Da die Menge des eingebauten NO_2 nicht bestimmt wurde, ist es unklar, ob die Restaktivierung durch substituiertes oder unsubstituiertes Clq verursacht wurde. Die Ergebnisse zeigen jedoch insgesamt, daß Nitrierung des Clq nicht die Bindung des Clr_2s_2 Tetramers, sondern seine Aktivierung reduziert. Auf Grund der erhaltenen Daten kann nicht entschieden werden, ob die Aromaten, die substituiert wurden, bei der Spaltung des Clr als H-Donatoren oder als nukleophile Agentien eine direkte Rolle spielen, oder ob durch die Substitution hydrophobe Bindungen geschwächt werden.

IV. Diskussion

Im ersten Teil der Arbeit wurden verschiedene Charakteristika der spontanen Clr Aktivierung untersucht. Die meisten von ihnen lassen vermuten, daß Proteasen, welche die Clr Lösungen verunreinigen, die spontane Clr Aktivierung verursachen. Positive Beweise dafür sind: 1. In einer Clr Lösung wurden Spurenproteine mit (^{14}C)DFP markiert, die Molekulargewichte zwischen 60 und 90 KD hatten (Abb. 14). 2. In Gegenwart von Ca^{2+} konnte durch DFP die spontane Clr Aktivierung für 2 Stunden gehemmt werden, wenn Clr bei 37 ^{o}C und einem pH zwischen pH 7 und pH 9 inkubiert wurde, ohne daß dabei die hämolytische Aktivität verloren ging (Abb. 10, Tabelle 2). Die Hemmwirkung des DFP blieb auch dann erhalten, wenn DFP zwischen der Vorinkubation und der Inkubation bei 37 ^{o}C wegdialysiert wurde. Diese Befunde zeigen, daß in Gegenwart von Ca^{2+} isoliertes Clr nicht durch einen intramolekularen Prozeß aktiviert wird. Sie schließen aber nicht aus, daß Clr im Cl Makromolekül durch einen derartigen Mechanismus aktiviert werden kann.

Die spontane Clr Aktivierung in Gegenwart von EDTA ist komplizierter. DFP Behandlung des isolierten Clr verringert die Geschwindigkeit der spontanen Clr Aktivierung bei 37 ^{o}C, hemmt sie aber nicht vollständig (Abb. 9). Dafür gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten: 1. In Gegenwart von EDTA ist die Clr H-Kette für Spuren von Nicht-Serin-Proteasen angreifbar. 2. Clr wird von einem intramolekularen Enzymort gespalten, der durch DFP nicht hemmbar ist.

Als Beweis für die Existenz eines intramolekularen Enzymortes wurde angeführt, daß die spontane Clr Aktivierung von der Konzentration unabhängig sei (23,38). Es wurde berichtet, daß die Geschwindigkeit der spontanen Clr Aktivierung zwischen 660 µg/ml und 320 µg/ml konstant ist. Diese Befunde konnten im angegebenen Konzentrationsbereich bestätigt werden. Die eigene Arbeit hat aber klar gezeigt, daß bei niedrigeren Konzentrationen zwischen 46.8 µg/ml und 11.7 µg/ml die Geschwindigkeit der Aktivierung konzentrationsabhängig ist und daß Clr unter 10 µg/ml bis zu 30 Minuten bei 37 °C stabil ist (Abb. 12). Die Interpretation der beobachteten Konzentrationsabhängigkeit ist, daß bei einer Proteinkonzentration über 50 µg/ml (250 nM) die Fremdproteasen unter Substratsättigung arbeiten. Da die Konzentrationen des Enzyms und des Substrats gleichzeitig angehoben werden, wird bei den Clr Konzentrationen über 50 µg/ml prozentual jeweils ein ähnlicher Anteil der Clr Moleküle pro Zeiteinheit gespalten. Erst unter 50 µg/ml arbeiten die Enzyme nicht mehr unter Substratsättigung, so daß die Geschwindigkeit der spontanen Clr Aktivierung abnimmt. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die beobachtete Konzentrationsabhängigkeit, die zu Gunsten eines intramolekularen Aktivierungsmechanismus sprechen würde, ist, daß das Clr Dimer bei einer Konzentration unter 10 µg/ml in die Monomere zerfällt und daß die Clr Monomere nicht mehr intramolekular aktivieren können. Die Sephacryl S-300 Säulenchromatographie des Clr, das bei einer Konzentration von von 6 µg/ml auf die Säule aufgetragen

wurde, hat aber gezeigt, daß Clr auch bei dieser niedrigen Konzentration an der üblichen 180 KD Stelle eluiert, obwohl es während der Chromatographie noch um den Faktor 10 auf 0.6 µg/ml verdünnt wird. Die Clr Moleküle liegen also bis zu einer Konzentration von 0.6 µg/ml als Dimere vor. Dies bedeutet, daß die bimolekulare Natur des Clr Aktivierungsprozesses der Grund für die Abnahme der Aktivierungsgeschwindigkeit ist und nicht der Zerfall des Clr Dimers in die Monomere. Dieses Ergebnis ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Fremdproteasen die spontane Clr Aktivierung verursachen.

Als weiterer Punkt, der für einen Autoaktivierungsmechanismus sprechen sollte, wurde die pH Abhängigkeit des Aktivierungsvorganges angeführt. Es wurde berichtet, daß spontane Clr Aktivierung im Bereich zwischen pH 6 und pH 10 auftritt (38). Dies wäre ein ungewöhnlich weiter Wirkungsbereich für Serinproteasen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß auch bei diesen hohen pH Werten enzymatische Vorgänge ablaufen, bis Clr bei pH 13.4 nicht mehr aktiviert wird (Abb. 11). Der pH Wert, bei dem keine Aktivierung mehr auftritt, ist von der Konzentration des Clr abhängig (Abb. 11a). Diese Befunde können zwar einen intramolekularen Vorgang nicht ausschließen. Da aber bei diesen pH Werten Clr seine hämolytische Aktivität weitgehend verliert (Abb. 16), ist es unwahrscheinlich, daß die Vorgänge bei den hohen pH Werten für physiologisch ablaufende Reaktionen des Clr Moleküls Bedeutung haben.

Ein wichtiger Punkt, der für die spontane Clr Aktivierung durch kontaminierende Proteasen spricht, ist, daß in Gegenwart von EDTA die Clr H-Kette öfter als einmal gespalten wird (Abb.13). Diese Beobachtung, die schon früher beschrieben wurde (38,40), ist vergleichbar mit Befunden, die bei der Clr Verdauung durch Trypsin erhoben wurden (54). Hier wurde gefunden, daß die Clr H-Kette in Gegenwart von EDTA öfter gespalten wurde als in Gegenwart von Ca^{2+}. In die gleiche Richtung deutet auch das ^{125}J Markierungsverhalten des Proenzym Clr, wo in Gegenwart von EDTA mehr ^{125}J in die H-Kette eingebaut wird als in Gegenwart von Ca^{2+} (Abb.23). Diese Ergebnisse zeigen, daß in Gegenwart von EDTA wichtige Teile der Clr H-Kette der Umgebung exponiert werden. Sie werden dadurch leichter angreifbar für ^{125}J oder für Proteasen, die entweder zugegeben werden wie Trypsin oder die als Verunreinigungen vorhanden sind. Die exponierte Stelle wird durch Ca^{2+} Entzug instabil und durch kurzzeitiges Erwärmen irreversibel zerstört (Abb. 16,18), so daß auch nach Recalcificierung keine hämolytische Aktivität wiedergewonnen werden kann.

Von Bedeutung dafür, wie man sich die Ca^{2+}-abhängige Komplexbildung vorzustellen hat, erscheint der Befund, daß Clr und Cls, wenn sie in einem EDTA haltigen Puffer bei 37 ^{o}C inkubiert werden, ihre Bindungskapazität verlieren (Tabelle 2), während die hämolytische Aktivität des Clq erhöht wird (Abb. 18). Über die Ca^{2+}-abhängige Cl Komplexbildung haben andere Autoren berichtet, daß Clr und Cls Ca^{2+} Ionen binden, aber nicht Clq (35) und daß das Cl

Makromolekül nicht in die Untereinheiten zerlegt wird, wenn bei einer Temperatur unter 3 ^{o}C die Ca^{2+} Ionen aus dem Cl Molekül ausgewaschen werden (57). Diese Befunde ergänzen sich. Sie lassen vermuten, daß die Funktion der Ca^{2+} Ionen darauf zurückzuführen ist, daß sie Proteinstrukturen aufrechterhalten, die es den Cl Untereinheiten ermöglichen, sich zusammenzulagern und nicht darauf, daß Ca^{2+} Ionen zwischen den einzelnen Molekülen Brücken bilden (Abb. 3). Solche Ca^{2+}-abhängige Strukturen sind offensichtlich nur im Clr und Cls Molekül vorhanden. Man kann also spekulieren, daß für die Anlagerung des Ca^{2+}-abhängigen Clr_2s_2 Tetramers an den Kollagenteil des Clq keine weiteren Ca^{2+} Ionen nötig sind.

In der Literatur, die sich mit Cl befaßt, wird immer wieder der Proteaseinhibitor NPGB beschrieben (33,36,38,58). Dies hat 2 Gründe: 1. NPGB kann die Clr Aktivierung im Cl Molekül hemmen (33,36). 2. Es wurde früher schon gefunden, daß NPGB an die Proenzyme Chymotrypsinogen (59) und Trypsinogen (60) bindet. Auf Grund dieser beiden Befunde wurde die Hypothese aufgestellt: a) Wenn NPGB die Cl Aktivierung hemmt, dann bindet es an die Enzymtasche des zymogenen Clr. b) Das aktive Serin des zymogenen Clr könne, wenn es vom Clq dazu stimuliert wird, die Polypeptidkette des eigenen oder des benachbarten Clr Moleküls spalten. Obwohl es noch nie gelungen ist, eine NPGB Bindung an die Proenzymtasche des Clr nachzuweisen, wird diese Hypothese immer noch als die wahrscheinlichste angesehen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß im Gegensatz zu aktiviertem $Cl\overline{s}$

weder zymogenes noch aktiviertes C1r für längere Zeit kovalent NPGB binden. Aktiviertes C1r reagiert aber mit NPGB. Ob Proenzym C1r mit NPGB reagiert, konnte nicht geklärt werden. Eine Stellungnahme zu der oben beschriebenen Hypothese ist auf der Basis dieser Arbeit nicht möglich. Man sollte aber in diesem Zusammenhang auch die Beobachtung erwähnen, daß C1q in Gegenwart von 50 µM NPGB sehr leicht ausfällt (Abb. 21). Dies könnte bedeuten, daß NPGB bei der Hemmung der C1 Aktivierung auch mit C1q interagiert.

Für eine direktere Beteiligung des C1q am Prozeß der C1 Aktivierung sprechen auch die ^{125}J Markierungsversuche. Diese haben gezeigt, daß C1r und C1q ihr Markierungsverhalten deutlich ändern, wenn Umgebungsbedingungen geändert werden, während die C1s Markierung von diesen Bedingungen unabhängig ist (Abb. 22-24). In Gegenwart von C1q, C1s, C1qs oder Ca^{2+} wird C1r Proenzym, ohne daß es gespalten wird in eine Form gebracht, die dem aktivierten $C1\bar{r}$ ähnlich ist. Der Anteil des ^{125}J in der C1r L-Kette nahm von 40% in Gegenwart von EDTA bis zu 75 % in Gegenwart von C1qs und Ca^{2+} zu. In die $C1\bar{r}$ Enzym L-Kette wurden 90 % des Markers eingebaut. Dieses Ergebnis läßt vermuten, daß es ein intermediäres C1r* gibt. Ob der Serinrest dieses C1r* aktiv ist, bleibt zu klären.

Die Veränderungen der C1s H-Kettenmarkierbarkeit dagegen sind wahrscheinlich durch die C1 Komplexbildung zu erklären. Sie wurden früher schon von Colomb et al. (61) an den aktivierten C1r und C1s Molekülen gefunden und konnten hier

durch Markierung der Proenzymformen bestätigt werden. Die gemeinsame Schlußfolgerung aus den erhaltenen Resultaten ist: Bei der Zusammenlagerung kommt die Cls H-Kette ins Innere des Clrs Komplexes und ist für ^{125}J schlechter zugänglich.

Die Veränderung des Clq Markierungsverhaltens, wenn Clq mit den anderen Cl Untereinheiten interagiert, ist aber nicht auf die gleiche Weise zu erklären (Abb. 24). Diese nämlich ist unabhängig vom Ca^{2+}. Außerdem wird der spezifische ^{125}J Einbau in das Clq Molekül durch einen 2 fachen Überschuß an Clr_2s_2 Tetrameren von 1.5 auf 1.7 erhöht. Der größte Teil des ^{125}J wird in die Clq C-Kette eingebaut (62,63) und innerhalb der C-Kette in das Tyrosin an der Stelle 5 (62,64). Es erscheint deshalb wahrscheinlich, daß die Interaktion des Clr_2s_2 Tetramers mit dem Kollagenteil des Clq den Bereich verändert, wo die Ketten durch Disulfidbrücken miteinander verbunden sind.

Obwohl diese Daten sehr deutlich zeigen, daß Clr und Clq ihr Markierungsverhalten unter den verschiedenen Bedingungen ändern, kann über den molekularen Hintergrund nur spekuliert werden. Es ist bekannt, daß das Hypojodit, das während der Markierung gebildet wird, bei pH 7.5 hauptsächlich an dissoziierte Tyrosinreste bindet (56), die sich an der Oberfläche eines Proteins befinden. Eine Veränderung des Markierungsverhalten kann demnach aus 2 Gründen erfolgen: 1. Die Tyrosinreste verschwinden von der Oberfläche. 2. Die Tyrosinreste verändern ihren Grad der Dissoziation dadurch,

daß sie ihre Interaktion mit den Nachbaraminosäuren verändern. Auf Grund der vorliegenden Daten kann nicht entschieden werden, welche der beiden Möglichkeiten zutrifft. Interessant sind die Markierungsversuche jedoch vor allem deshalb, weil die Veränderungen der Clq Markierbarkeit an einer Stelle des Clq Moleküls auftreten, wo bisher die Bindungsstelle des Clr_2s_2 Komplexes an Clq vermutet wurde (25,26,65).

Die Jodierung, die in ortho-Stellung zur Hydroxylgruppe des Tyrosins erfolgt, reduziert außerdem die Aktivierungsgeschwindigkeit von Clr. Die weitgehend quantitative Substitution der ortho-Stellung durch Nitrierung bewirkt einen Verlust der hämolytischen Aktivität von Clq und Clr, ohne die Fähigkeit dieser Moleküle zur Cl Komplexbildung zu zerstören. Dies läßt vermuten, daß Tyrosinreste des Clr und Clq bei der Cl Aktivierung eine Rolle spielen.

V. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen Beitrag zur Klärung der Frage zu leisten: Wie wird C1r, die erste Protease des Komplementsystems, aktiviert, wenn das C1 Makromolekül über die Köpfe der C1q Untereinheit an Antigen-Antikörperkomplexe bindet?

In dieser Arbeit wurden folgende Ergebnisse erzielt:

1. An Hand verschiedener Kriterien (DFP Hemmung, Konzentrations-, pH-, Ca^{2+}- und EDTA-Abhängigkeit) wurde gezeigt, daß die spontane C1r Aktivierung durch kontaminierende Proteasen verursacht wird. Die spontane C1r Aktivierung ist demnach keine Modellreaktion für die C1r Aktivierung im C1 Molekül.

2. Die Funktion der Ca^{2+} Ionen, welche für die C1 Komplexbildung von entscheidender Bedeutung sind, beruht darauf, daß sie Teile der C1r und C1s Untereinheiten stabilisieren, die für die Zusammenlagerung dieser Proteine wichtig sind, und nicht darauf, daß sie zwischen 2 Molekülen Brücken bilden. Ca^{2+} Entzug bei C1r führt bei Temperaturen über 0 - 4 ^{o}C zum irreversiblen Verlust der Fähigkeit, in den C1 Komplex zu integrieren.

3. C1r und C1q, aber nicht C1s ändern ihr ^{125}J Markierungsverhalten während der C1 Aktivierung und der C1 Komplexbildung. Dies deutet darauf hin, daß die Tyrosinreste, welche durch ^{125}J markiert werden, ihre Positionen im Molekül bei diesen Vorgängen verändern, was eine Änderung der Proteinkonformation bedeutet.

4. Substitution der Tyrosinreste durch ^{125}J oder NO_2

reduziert die hämolytische Aktivität von Clq und Clr, nicht aber von Cls. Die Komplexierungsfähigkeit der Komponenten wird durch die Substitution nicht beeinträchtigt. Die Befunde deuten auf eine Beteiligung von Tyrosinresten der Clr und Clq Untereinheiten am Clr Aktivierungsvorgang im Cl Makromolekül hin.

VI. Literaturverzeichnis

1. Behring,E. (1890) Deut.Med.Woch. 16,1145-1148
2. Bordet,J. (1896) Ann.Inst.Pasteur Paris 10,193-219
3. Ehrlich,P. & Morgenroth, (1899) Berl.Klin.Wochenschrift 36,6-9
4. Müller-Eberhard,H.J.,Nilson,U.R. & Aronsson,T. (1960) J.Exp.Med. 111,201-215
5. Müller-Eberhard,H.J. & Kunkel,H. (1961) Proc.Soc.Exp. Bio.Med. 106,291-302
6. Esser,A.F. (1981) Biological Membranes Herausgeber: Dennis Chapman in Akademic Press, Kapitel 4
7. Porter,R.R. & Reid,K.B.M. (1978) Nature 275,699-704
8. Lepow,I.H.,Naff,G.B.,Todd,E.W.,Pensky,J. & Heinz,C.F. (1963) J.Exp.Med. 117,983-1003
9. Calcott,M.A. & Müller-Eberhard,H.J. (1972) Biochemistry 11,3443-3450
10. Yonumasu,K. & Stroud,R.M. (1972) Immunochemistry 9,545-554
11. Reid,K.B.M.,Lowe,D.M. & Porter,R.R. (1972) Biochem.J. 130,749-763
12. Svehag,S.E. & Bloth,B. (1970) Acta Pathol.Microbiol. Scand.Sect.B. 78,260-262
13. Knobel,H.R.,Villegar,W. & Isliker,H. (1975) Eur.J. Immunol. 88,690-701
14. Reid,K.B.M. (1976) Biochem.J. 155,5-17
15. Brodsky-Doyle,B.,Leonard,K.R. & Reid,K.B.M. (1976) Biochem.J. 159,279-286
16. Taronta,A. & Franklin,E.C. (1961) Science 134,1981-1982

17. Deisenhofer,J.,Colman,P.M.,Epp,O. & Huber,R. (1976) H-S.Z.Physl. 357,1421-1434

18. Bub,F. & Loos,M. (1980) 5. Europ.Compl.Workshop, Lund S.3

19. Tschopp,J.,Schulthess,T.,Engel,J. & Jaton,J.C. (1979) FEBS Letter 112,152-157

20. Tschopp,J.,Villegar,W.,Lustig,A. & Jaton,J.C. (1980) Eur.J.Immunol. 10,529-535

21. Valet,G. & Cooper,N.R. (1974) J.Immunol. 112,1667-1673

22. Valet,G. & Cooper,N.R. (1974) J.Immunol. 112,339-350

23. Ziccardi,R.J. & Cooper,N.R. (1976) J.Immunol. 116, 496-504

24. Gigli,I.,Porter,R.R. & Sim,R.B. (1976) Biochem.J. 157,541-548

25. Reid,K.B.M.,Sim,R.B. & Faiers,A.P. (1977) Biochem.J. 161,239-245

26. Valet,G.,Kahle,H. & Timpl,R. (1978) Z.Immun.Imm. 155,71-71

27. Sim,R.B.,Porter,R.R.,Reid,K.B.M. & Gigli,I. (1977) Biochem.J. 163,219-227

28. Matthews,B.W.,Sigler,P.B.,Henderson,R. & Blaw,D.M. (1967) Nature 214,652-656

29. Bode,W. & Schwager,P. (1975) J.Mol.Biol. 98,693-717

30. Sakai,K. & Stroud,R.M. (1974) Immunochemistry 11,191-196

31. Müller-Eberhard,H.J.,Polley,M.J. & Calcott,M.A. (1967) J.Exp.Med. 125,359-380

32. Loos,M.,Borsos,T. & Kopp,H.J. (1972) J.Immunol. 108, 390-395

33. Dodds,A.W.,Sim,R.B.,Porter,R.R. & Kerr,M.A. (1978) Biochem.J. 175,383-390

34. Hruska,J.F.,Law,J.H. & Kezdy,F.J. (1969) Biochem. Biophys.Res.Commun. 36,272-277

35. Villier,C.L.,Arlaud,G.J.,Painter,R.H. & Colomb,M.G. (1980) FEBS Lett. 117,289-294

36. Medicus,R.G. & Chapuis,R.M. (1980) J.Immunol. 125, 390-395

37. Ziccardi,R.J. & Cooper,N.R. (1976) J.Immunol. 116, 504-509

38. Arlaud,G.J.,Villiers,C.C.,Chesne,S.,Painter,R.H. & Colomb,M.G. (1980) Biochem.Biophys.Acta 616,116-129

39. Tabahashi,K.,Nagasawa,S. & Koyama,J. (1976) FEBS Lett. 65,20-23

40. Assimeh,S.N.,Chapuis,R.M. & Isliker,H. (1978) Immunochemistry 15,13-17

41. Weiner,E.M. & Valet,G. (1977) Z.Immun.Imm. 153,363-363

42. Zubler,R.H.,Lange,G.,Lambert,A.H. & Miescher,P.H. (1976) J.Immunol. 116,232-235

43. Lowry,D.H.,Rosenbrough,N.J.,Farr,A.L. & Randall,R.J. (1951) J.Biol.Chem. 193,265-275

44. Bradford,M.M. (1976) Analyt.Bioc. 72,248-254

45. Jansen,E.F.,Nutting,M-D.F.,Jang,R. & Balls,A.V. (1949) J.Biol.Chem. 179,189-199

46. Rapp,H.J. & Borsos,T. (1963) J.Immunol. 91,826-832

47. Rapp,H.J. & Borsos,T. (1970) Molecular Basis of Complement Action, Appleton Century Crafts, New York

48. Davies,B. (1964) Ann.N.Y.Acad.Sci. 121,404-427

49. Oakley,B.R.,Kirsch,D.R. & Morris,N.R. (1980) Analyt. Bioc. 105,361-363

50. Axen,R.,Porath,J. & Embach,S. (1967) Nature 214, 1302-1304

51. Mc.Conahey,P. & Dixon,F.J. (1966) Int.Arch.Allergy Immunol. 29,185-193

52. Reid,K.B.M. & Porter,R.R. (1976) Biochem.J. 155,19-23

53. Blackburn,S. Enzyme structure and function (1976) Herausgeber: Marcel Denker, Inc. New York S.169-219

54. Valet,G.,Bauer,J. & Kahle,H. (1981) H-S Z.Physl. 362,26-26

55. Kirschner,M.W. & Schachman,H.K. (1973) Biochenistry 12,2987-2997

56. Seon,B.K.,Roholt,D.A. & Pressman,D. (1970) Biochem.Biophys.Acta. 221,114-118

57. Medicus,R.G.,Chapuis,R.M. & Borsos,T. (1978) 5. Europ.Compl.Workshop Cambridge S.5

58. Andrew,J.M. & Baillie,R.D. (1979) J.Immunol. 123,1403-1408

59. Gertler,A.,Walsh,K.A. & Neurath,H. (1974) Biochemistry 13,1302-1310

60. Bode,W. & Huber,R. (1978) FEBS Lett. 68,231-236

61. Villiers,C.L.,Arlaud.G.J.,Reboul,A.,Thielens,N. & Colomb,M.G. (1980) J.Immunol. 124,1543-1543

62. Lin.T. & Flechter,D.S. (1978) Immunochemistry 15,107-117

63. Heusser,C.,Boesmann,M.,Knobel,H.R.,Jacot-Guillarmod

H. & Isliker,H. (1975) Immunochemistry 12,213-219

64. Reid,K.B.M. (1977) Biochem.J. 161,247-251

65. Fuchs,H.,Lustig,A.,Tschopp,J. & Engel,J. (1981) H-S Z.Physl. 362,24-24

Lebenslauf

9.4.1952	geboren in Pestendorf als Sohn des Landwirtes Johann Bauer und seiner Ehefrau Walburga, geb. Schranner.
1958-1964	Volksschule in Weng
1964-1973	Humanistisches Gymnasium in Straubing
1973	Reifeprüfung
1973-1977	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
1977	Diplomprüfung
1977-1978	Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried
1978-1981	Doktorarbeit am Max-Planck-Institut für Biochemie in Martinsried